مدينة الملك عبد العزيز للعلوم والتقنية

المنظمة العربية للترجمة

رولف د. شميد

دليل التقانة الحيوية والهندسة الوراثية

ترجمة

د. نجم الدين جميل الشرابي أ. محمد سامر الرفاعي د. أنطونيوس الداود



سلسلة كتب التقنيات الاستراتيجية والمتقدّمة

تمهيـــد

إن التقانة الحيوية، التقانة المفتاح في القرن الحادي والعشرين، هي مسعى تخصصي يفوق جميع الحقول الأخرى. فاعتماداً على الهدف المحدد، تتطلب هذه التقانة المعرفة بعلم الأحياء العام، علم الوراثة الجزيئية، وعلم أحياء الخلايا؛ وبعلم الوراثة البشري والطب الجزيئي؛ وبعلم الفيروسات، علم الأحياء المجهرية، والكيمياء الحيوية؛ وبعلوم الزراعة والغذاء، وبتقانة الأنزيمات، وهندسة العمليات الحيوية، وعلم النظم. إضافة إلى ذلك، تلعب الحوسبة الحيوية (biocomputing) والمعلوماتية الحيوية (bioinformatics) دوراً متنامياً غير مسبوق. وعليه، فإنه من المفاجئ إلى حدٍّ ما أن يكون هناك القليل من كتب التدريس، الموجزة، التي تحاول أن تغطي هذه الحقول كافة. كما أن مظاهر مطبَّقة كتربية النباتات والحيوانات أو التقانة الحيوية التحليلية غالباً ما تكون مفقودة حتى من الدراسات المتعددة الأحجام.

من جهةٍ أخرى، لقد تكوّنت لديّ خبرة خلال دراساتي الخاصة الطويلة، وكذلك لدى تعليمي لتلامذتي، كم هو محفز القيام بإبراز، بين الحين والآخر، التفاصيل التي ينبغي تعلمها، وذلك من بين آلاف التفاصيل الأخرى من أجل تكوين رؤية موحدة.

إن «دليل التقانة الحيوية والهندسة الوراثية» هو محاولة لتأمين هذا النوع من الأفق وبعين دقيقة ثاقبة، فعلى نحو لا يمكن إنكاره، من الجرأة مناقشة كلٍّ من مواضيع الكتب هذه والتي تتراوح ما بين «الميثان»، و«هندسة الأنسجة» و«علم أحياء النظم» في صفحة نصية واحدة متبوعة بصفحة واحدة من الرسومات والجداول. في حين تمّ تكريس دراسات وفصول كتب ومقالات نقدية ومئات من المنشورات العلمية لتناول أي مدخل فردي تم تناوله في هذا الكتاب (العديد منها مقدم في الاقتباسات من المادة المطبوعة للدراسات العلمية). من جهة أخرى، إن التحدي في استعراض كل مدخل بالكاد يتخطى الـ 4000 حرف، ما يدفع الفرد إلى التركيز على النقاط الأساسية ووضعها ضمن أفق أوسع.

آمل أن أكون قد نجحت أقلّه، إلى حدٍّ ما، في هذا المسعى، بحيث ستجد الأدلة للعودة بأمان من العالم الشديد التخصص في العلم، ومصطلحاته المعقدة، إلى تقييمك الخاص للفرص والتحديات التي تقدمها التقانة الحيوية الحديثة لنا جميعاً.

هذه النسخة الإنجليزية هي ليست ترجمة بسيطة للنسخة الأصلية، التي نُشِرت في ألمانيا في كانون الأول/ ديسمبر 2001، لكنها طبعة ثانية محسّنة وموسّعة: تحتوي، بعيداً عن التحديث العام للبيانات، ثلاثة مواضيع جديدة (هندسة الأنسجة، الـ RNA، وعلم أحياء النظم).

وعند هذا القدر، يعود شكري إلى بعض الناس الذين ساهموا بشكل أساسي في هذا الكتاب. فقبل كل شيء، أتمنى أن أوجّه شكري إلى موهبة الرسم روث هامليل (Ruth Hammelehle)، وكركايم (Kirchheim)، ألمانيا، الذي قام بعمل عظيم في ترجمة اللغة العلمية إلى رسومات واضحة وجميلة جداً،

ومارجوري تيفيرت (Marjorie Tiefert)، وسان رامون (San Ramon)، كاليفورنيا، التي كانت أكثر من محررة: فقد حافظت وعبّرت عن الروح الأصيلة لهذا الكتاب. كما أتوجّه بالشكر إلى الناشر، رومي كيرستين (Romy Kirsten) بالتحديد. وشكر مميز أيضاً للزملاء الكثيرين في الأكاديمية والصناعة الذين ساهموا بوقتهم وطاقتهم للقراءة في مداخل (مواضيع) الكتاب ضمن مجالات خبرتهم وتزويدهم إياي بالاقتراحات والتصحيحات الأكثر نفعاً. وهؤلاء هم: ماكس رور (Max Roehr)، جامعة فيينا؛ وواندر ريثورست (Waander Riethorst)، Biochemie GmbH، وبون (Bonn)؛ وبيتر دير (Peter Duerre)، جامعة Ulm؛ وإدلتروت ماستغيراش (Edeltraut MastGerlach)، Ulf Stahl وديتريتش كنور (Dietrich Knorr)، جامعة برلين التقنية؛ وأودو غريف (Udo Graefe)، معهد Hans-Knoell، وجينا (Jena)؛ وجوشن بيرلين (Jochen Berlin)، GBF، وبرانسشويغ (Braunschweig)؛ وآلان سفينسون (Allan Svenson)، A/S Novozymes، كوبنهاغن؛ وهيلمات أليغ (Helmut Uhlig)، وبريساج (Breisach)؛ وفريدير سكيلير (Frieder Scheller)، جامعة Potsdam؛ وبيرتولد هوك (Bertold Hock)، جامعة ميونيخ- ووينستسفان (Weihenstephan)؛ وورولف بلايتش (Rolf Blaich)، ورولف كلوز (Rolf Claus)، وهيمات غيلديرمان (Helmut Geldermann) وغيرد ويبر (Gerd Weber)، جامعة Hohenheim؛ وهانس- جوشيم كناكماس (Hans-Joachim Knackmuss)، وديتر جيندروسيك (Dieter Jendrossek)، وكارل هينريتش إنجيسير (Karl Heinrich Engesser)، وجورج ميتزغر (Joerg Metzger)، وبيتير سكوريتش (Peter Scheurich)، وألريتش أيزيل (Ulrich Eisel)، وماتياس روس (Matthias Reuss)، وكلوس ماش (Klaus Mauch)، وكريستوف سيلداتك (Christoph Syldatk)، وميشال ثام (Michael Thumm)، وجوزيف أتينبوتشنير (Joseph Altenbuchner)، وبول كيلير (Paul Keller) وألريتش كال (Ulrich Kull)، جامعة Stuttgart؛ وثوماس فون سكيل (Thomas von Schell)، جامعة Stuttgart، وجوشيم سيدل (Joachim Siedel)، Roche AG، Penzberg؛ وورولف ويرنير (RolfWerner) وكرستين مير (Kerstin Maier)، Boehringer-Ingelheim، Biberach؛ وفرانك أندري جنكل (Frank-Andreas Gunkel)، Bayer AG، Wuppertal؛ وميشال بروكير (Michael Broeker)، Chiron Bering، Marburg؛ وبيرنارد أور (Bernhard Hauer)، أو بريسلر (Uwe Pressler)، BASF AG، Ludwigshafen؛ وفرانك زوشر (Frank Zocher)، Aventis Pharma، Hoechst؛ وتيلمان سبيلغ (Tilmann Spellig)، Schering AG، Bergkamen؛ وأكيرا كنيناكا (Akira Kuninaka)، Yamasa Corporation، Chosi؛ وآين ساثيرلاند (Ian Sutherland)، جامعة Edinburgh؛ وجوليا سكولر (Julia Schueler)؛ وإيرنست (Ernst) ويونغ فرانكفارت .(Young Frankfurt) وضمن أفراد كثيرين في معهدي في شتوتغارت (Stuttgart) الذين ساعدوني بصبر في المخطوطة الكتابية، فإنني أتمنى أن أتوجّه بالشكر إلى جوتا شميت (Jutta Schmitt)، وتيل باتشمان (Till Batcmann)، وجورغين بليس (Jurgen Pleiss) ودانيل أبيل (Danie Appel).

وعلى الرغم من محاولات الإصلاح وتفقد الكتاب، فإنه من المعجزة عدم وجود غموض أو أخطاء ما في هذا الكتاب، التي هي تماماً من خطأ المؤلف. كما أنني سوف أكون الأكثر امتناناً لجميع القراء الذين سيتيحون لي أن أعلم أين يمكن تحسين هذا الكتاب أكثر من خلال العنوان على الشبكة العنكبوتية <http://www.itb.unistuttgart.de/pocketguide>.

رولف شميد (Rolf D. Schmid)

شتوتغارت (Stuttgart)، **2002/ 2003**

المقدمـة

إنّ الدليل الاسترشادي هذا مُعَدٌّ لطلاب علم الأحياء والكيمياء الحيوية وهندسة العمليات الحيوية الذين يبحثون عن أولى الدراسات التي تتناول مجالات التقانة الحيوية الحديثة (modern biotechnology) المتعددة. وحيث إنه كُتب بشكل نموذجي مع عدد جيد من الاقتباسات العلمية لكلّ موضوع، ودليل شامل، فإنه يمكن أن يستعمل كنقطة بداية لدراسات أعمق.

يحتوي هذا الدليل على لوحات ملونة لـ 142 مجالاً من مجالات المواضيع المطروحة بحيث يُكمِّل كل موضوع صفحة نصّيّة. كما أن هناك عناوين ملونة لأعمدة النصوص على كل صفحة للتسهيل على القارئ التنقل ضمن الكتاب.

يبدأ هذا الدليل أولاً بمسح تاريخي قصير، ولأن التقانة الحيوية كانت دائماً علماً تطبيقياً ستجد في هذا القسم أول البيانات التي تُظهر الأهمية الاقتصادية لبعض المنتجات الحيوية. لقد كانت **تقانة الغذاء الحيوية** نقطة البداية لحقل التقانة الحيوية ككل، ولهذا جرت مناقشتها في الموضوع التالي مباشرة. فلقد تطورت أولى عمليات التقانة الحيوية الحديثة اعتماداً على هذه المهارات القديمة، فمكّنت من إنتاج **الكحول والأحماض والأحماض الأمينية**، ثم تبعها إنتاج مضادات الحيوية **والكيمياويات المتخصصة** والمجموعة الهامة من **الأنزيمات** التحليلية والتقنية، بالإضافة إلى **خميرة الخباز وخمائر العلف** التي تمّ إنتاجها ختاماً. أما قسم **التقانة الحيوية البيئية** فيُصوِّر عمليات تنظيف الماء والهواء والتربة، كما يضم عمليات الارتشاح الميكروبي (microbial leaching). وقد خُصِّص قسمٌ كبير من هذا الدليل **للتقانة الحيوية الطبية**، وهو يشمل مواضيع عن تحضير المستحضرات الدوائية، مثل العامل VIII والإريثروبويتين (erythropoietin)، واللقاحات والأجسام المضادة (antibodies) والمعايرات المناعية (immunoassays) والمستشعرات الحيوية (biosensors). كما جرت مراجعة الجهاز المناعي باختصار، ثم تبعها تبيان لسمات الخلايا الجذعية (stem cells)، وما ينشأ عن هندسة الأنسجة. بالإضافة إلى تكريس قسم كبير آخر **للتقانة الحيوية الزراعية**، يتناول بشكل خاص عمليات تربية وتأصيل (breeding) الحيوانات والنباتات، وكذلك الكلونة (cloning) والتعديلات الوراثية.

والجزء الثاني من هذا الدليل خُصِّص للمعارف والتقانات الأساسية التي تشكل جوهر التقانة الحيوية الحديثة. يبدأ هذا الجزء **بمبادئ علم أحياء الجراثيم** (microbiological fundamentals) تتبعها **مبادئ هندسة العمليات** (process engineering)، ثم **مبادئ الوراثة الجزيئية** (molecular genetics) التي تم التطرّق إليها بشكل موسّع ومُعمَّق.

أما **الجزء الأخير** فقد خُصِّص لمناقشة **التوجهات الحديثة** و**مسائل الأمان، كما تلاها التعرض للمواضيع الأخلاقية والاقتصادية**. يضم هذا الجزء المجالات الحديثة لتطبيقات التقانة الحيوية، مثل صفيفات الـ DNA (DNA arrays)، ودراسة البروتيوم (proteomics)، والهندسة الأيضية (metabolic engeneering) وبيولوجيا (علم أحياء) النظم (systems biology)، بالإضافة إلى المواضيع المتعلقة بقلق العامة ومنح براءات الاختراع والهيئات الدولية التي تُعنى بمجال التقانة، هذا المجال الهام اقتصادياً.

آمل أن يقدم لك هذا الدليل الشامل المساعدة، مع شروحاتٍ عن مواضيع أخرى، إذا كانت المصطلحات التقنية العديدة في مجال ما تزيد على خبرتك. فقد ركّز دليل المراجع في هذا الكتاب على الاقتباسات باللغة الإنجليزية فقط، مع سيطرة الدراسات (monographs) والمقالات النقدية (reviews) الحديثة. كما تتوفر معلومات أكثر حول مواضيع جرت مناقشتها في هذا الدليل على الشبكة الإلكترونية حيث يمكن العودة إليها، مثل موقع PubMed.

المحتويـــات

تقديــــم

سلسلة كتب التقنيات الاستراتيجية والمتقدمة
ضمن مبادرة الملك عبد الله للمحتوى العربي

يطيب لي أن أقدّم لهذه السلسلة التي جرى انتقاؤها في مجالات تقنية ذات أولوية للقارئ العربي في عصر أصبحت فيه المعرفة محركاً أساسياً للنمو الاقتصادي والتقني، ويأتي نشر هذه السلسلة بالتعاون بين مدينة الملك عبد العزيز للعلوم والتقنية والمنظمة العربية للترجمة، ويقع في إطار تلبية عدة سياسات وتوصيات تعنى باللغة العربية والعلوم، ومنها:

أولاً: البيان الختامي لمؤتمر القمة العربي المنعقد في الرياض 1428هـ ـ 2007م الذي يؤكد ضرورة الاهتمام باللغة العربية، وأن تكون هي لغة البحث العلمي والمعاملات، حيث نص على ما يأتي: (وجوب حضور اللغة العربية في جميع الميادين، بما في ذلك وسائل الاتصال، والإعلام، والإنترنت، وغيرها).

ثانياً: «السياسة الوطنية للعلوم والتقنية» في المملكة العربية السعودية التي انبثق عنها اعتماد إحدى عشرة تقنية استراتيجية هي: المياه، والبترول والغاز، والبتروكيميائيات، والتقنيات المتناهية الصغر (النانو)، والتقنية الحيوية، وتقنية المعلومات، والإلكترونيات والاتصالات والضوئيات، والفضاء والطيران، والطاقة، والمواد المتقدمة، والبيئة.

ثالثاً: مبادرة الملك عبد الله للمحتوى العربي التي تفعِّل أيضاً ما جاء في أولاً عن حضور اللغة العربية في الإنترنت، حيث تهدف إلى إثراء المحتوى العربي عبر عدة مشاريع تنفذها مدينة الملك عبد العزيز للعلوم والتقنية بالتعاون مع جهات مختلفة داخل المملكة وخارجها. ومن هذه المشاريع ما يتعلق برقمنة المحتوى العربي القائم على شكل ورقي وإتاحته على شبكة الإنترنت، ومنها ما يتعلق بترجمة الكتب المهمة، وبخاصة العلمية، ممّا يساعد على إثراء المحتوى العلمي بالترجمة من اللغات الأخرى إلى اللغة العربية بهدف تزويد القارئ العربي بعلم نافع مفيد.

تشتمل السلسلة على ثلاثة كتب في كل من التقنيات التي حددتها «السياسة الوطنية للعلوم والتقنية». واختيرت الكتب بحيث يكون **الأول** مرجعاً عالمياً معروفاً في تلك التقنية، ويكون **الثاني** كتاباً جامعياً، و**الثالث** كتاباً عاماً موجّهاً إلى عامة المهتمين، وقد يغطي كتاب واحد أو أكثر ذلك مجتمعاً. وعليه، تشتمل سلسلة كتب التقنيات الاستراتيجية والمتقدمة على ما مجموعه ثلاثة وثلاثين كتاباً

مترجماً، كما خصّص كتاب إضافي منفرد للمصطلحات العلمية والتقنية المعتمدة في هذه السلسلة كمعجم للمصطلح.

لقد جرى انتقاء الكتب وفق معايير، منها أن يكون الكتاب من أمهات الكتب في تلك التقنية، ولمؤلفين يُشهد لهم عالمياً، وأنه صدر بعد عام 2000، وأن لا يكون ضيق الاختصاص بحيث يخاطب فئة محدودة، وأن تكون النسخة التي يترجم عنها مكتوبة باللغة التي ألّف بها الكتاب، وليست مترجمة عن لغة أخرى، وأخيراً أن يكون موضوع الكتاب ونهجه عملياً تطبيقياً يصبّ في جهود نقل التقنية والابتكار، ويساهم في عملية التنمية الاقتصادية من خلال زيادة المحتوى المعرفي العربي.

إن مدينة الملك عبد العزيز للعلوم والتقنية سعيدة بصدور هذه المجموعة من الكتب، وأودّ أن أشكر المنظمة العربية للترجمة على الجهود التي بذلتها لتحقيق الجودة العالية في الترجمة والمراجعة والتحرير والإخراج، وعلى حسن انتقائها للمترجمين المتخصصين، وعلى سرعة الإنجاز، كما أشكر اللجنة العلمية للمجموعة التي أنيط بها الإشراف على إنجازها في المنظمة، وكذلك زملائي في مدينة الملك عبد العزيز للعلوم والتقنية الذين يتابعون تنفيذ مبادرة الملك عبد الله للمحتوى العربي.

الرياض 20/ 3/ 1431هـ
رئيس مدينة الملك عبد العزيز للعلوم والتقنية
د. محمد بن إبراهيم السويل

● في النسخة العربية، تمّ حذف ترجمة الصفحات التي أوردت معلومات عن المشروبات الكحولية، بمختلف أشكالها (البيرة، الويسكي، الشمبانيا. . .)، وهي تحديداً، كما جاءت في الطبعة الأجنبية الصفحات: 6، 7، 8، 9، مع جداولها.

(المحرر)

مسح تاريخي

التطورات القديمة (Early developments)

تأريخ (History)، يبدو أن ما نطلق عليه اسم التقانة الحيوية (biotechnology) اليوم كان قد نشأ مع الزراعة، حيث يمكن أن يرجع إلى فجر التاريخ حين بدأ الإنسان يستشعر تجربة تلف الطعام نتيجة الإفساد الميكروبي وحفظه بالتجفيف أو التمليح أو إضافة السكر، بالإضافة إلى إدراكه لتأثير المشروبات الكحولية المتخمرة. ومع تطور أولى حضارات المدن نجد وثائق ورسومات عن تحضير الخبز والبيرة والنبيذ والجبن ودبغ الجلود، وذلك باستخدام مبادئ التقانة الحيوية.

في أوروبا، وبدءاً من القرن السادس، طوّرت الأديرة من خلال هيكلها الأساسي المتقن التنظيم بروتوكولات لفنون صناعة البيرة والخمر والخبز. ومع ذلك، فإن التقانات الحيوية الحديثة هي وليدة علم الأحياء المجهرية (microbiology)، وهي تطورت بشكل ملموس في أواخر القرن التاسع عشر. كما قدمت الحربان العالميتان الأولى والثانية في النصف الأول من القرن العشرين التحدي الأكبر لعلماء الأحياء المجهرية والكيميائيين والمهندسين لإنشاء التقانة الحيوية الصناعية الحديثة التي تعتمد على منتجات مثل المذيبات العضوية (organic solvents) ومضادات الحيوية (antibiotics). فخلال هذه الفترة وبعدها بزغت اكتشافات وتطورات على يد علماء الكيمياء الحيوية والوراثة وعلم الأحياء الخلوية (cellular biologists)، وكوّنت ما نسميه علم الأحياء الجزيئية (molecular biology). وعند هذه النقطة أصبح المسرح جاهزاً للتقانة الحيوية الحديثة القائمة على الهندسة الوراثية والهندسة الخلوية لكي تظهر، وذلك خلال فترة السبعينيات والثمانينيات.

في الختام، ومع قدوم تقانة المعلومات (information technology)، اعطت التقانات الحيوية الحديثة ما يُعرف بدراسات الجينوم (Genomics) والبروتيوم (Proteomics) والخلايا (Cellomics) التي تَعد بالتطور إلى تقانات القرن 21 الأساسية، وتوفُّر عدد كبير من التطبيقات في الطب والغذاء والزراعة والكيمياء وحماية البيئة.

أوائل الرواد وأُولى المنتجات: إن التقانة الحيوية هي علم تطبيقي ـ يقود الدافع الاقتصادي كثيراً من تطوراته. في العام 1864 استعمل الكيميائي الفرنسي، لويس باستور (Louis Pasteur) المجهر للمرة الأولى لتتبع تخمر النبيذ إلى حمض اللبن (lactic acid). وباستعمال أوساط معقمة («البسترة» «pasteurization») حصل على مزارع نقية للكائنات المجهرية، موطداً بذلك علم الأحياء المجهرية (microbiology) التطبيقي وموسعاً هذا المجال إلى إمكانية التحكم بالكائنات المجهرية الممرضة (pathogenic microorganisms). مع بداية القرن 20 خطر للكيميائي الألماني أوتوريهام (Otto Roehm) والعالم الياباني جوكيشي تاكامين (Jokichi Takamine) أن الأنزيمات المعزولة من الفضلات الحيوانية أو الزرعات العفَنيَّة يمكن أن تكون محفزات (catalysts) مفيدة في العمليات الصناعية. وقد أحدثت فكرة أوتوريهام ثورة في صناعة الدباغة التي كانت تجري حتى ذلك الوقت باستعمال براز الكلاب. وفي مجال الصحة العامة، كان التمهيد بمعالجة مياه المجاري بيولوجياً حوالى العام 1900 الحجر الأساس في الوقاية من الأوبئة. بعد ذلك، وخلال الحرب العالمية الأولى، طوّر كارل نيوبرغ (Carl Neuberg) في ألمانيا وحاييم وايزمان (Chaim Weizmann)، الروسي المهاجر إلى بريطانيا وهو من أصل يهودي، عمليات تخمير على مستوى ضخم لتحضير مكونات الذخائر الحربية (الغليسرول (glycerol) من أجل النيتروغليسرول (nitroglycerol) والأسيتون (acetone) من أجل الكوردايت (Cordite)). كما كان لوعد بلفور (Balfour) وما تبعه من تأسيس لدولة إسرائيل، التي أصبح وايزمان أول رئيس لها، ارتباط مباشر بالنجاح المبكر للتقانة الحيوية. وفي فترة ما بعد الحرب، أصبح مركب 1 ـ بوتانول (1-Butanol)، وهو المنتج الثاني لتخمرات وايزمان المعتمدة على الـ Clostridium، عالي الأهمية في الولايات المتحدة كمذيب لطلاء السيارات.

بالإضافة إلى ذلك، أطلق اكتشاف البنسلين (penicillin) مصادفةً من قبل الكسندر فلمنغ (Alexandr Fleming) عام 1922، والذي طوّره هوارد فلوري (Howard Florey) فيما بعد ليصبح دواءاً، إنتاج هذا المضاد الحيوي (antibiotic) بالإضافة إلى مضادات حيوية أخرى خلال الحرب العالمية الثانية. وبذلك، مع بدايات عام 1950 تم عزل أكثر من 1000 مضاد حيوي مختلف بحيث تزايد استخدامهم في المجال الطبي وأعلاف الحيوانات ووقاية المزروعات. ومنذ عام 1950 أدى الاستعمال التحليلي (analytical use) للأنزيمات، وبعد ذلك للأجسام المضادة، إلى فتح حقلٍ جديدٍ هام في التقانة الحيوية الحديثة. ففي ظل كوارث النِّفط عام 1960 وزيادة الوعي بالتزايد السكاني، جرى تطوير عمليات تحويل الكتلة الحيوية إلى طاقة حيوية (bioenergy) (الإيثانول (ethanol)، الميثان (methan)) وإنتاج بروتين خلية منفردة من النفط أو الميثانول.

التقانة الحيوية في رسومات الفراعنة





1 صناعة البيرة
2 صناعة الخبز
3 دباغة الجلود

التاريخ	
القديم	تخمير العصائر الحلوية على السكر إلى مشروبات كحولية متنوعة.
	تحضير منتجات اللبن الحامض (sour milk) والعجين المتخمر(sourdough) عن طريق تخمر حمض اللبن (lactic acid) والخميرة.
	دباغة الجلود باستعمال كواشف مثل براز الحيوان.
1650	فرنسا: إجراءات أورلينس (Orleans) لتحضير الخل من الإيثانول(ethanol) .
~1680	هولندا: شاهد أنطوني فان ليفينهوك (Anthony van Leeuwenhoek) البكتيريا من خلال المجهر.
1856	فرنسا: فصل لويس باستور (Louis Pasteur) خميرة البيرة عن بكتيريا حمض اللبن (lactic acid bacteria) .
~1880	فرنسا, ألمانيا: طور لويس باستور (Louis Pasteur) وروبرت كوخ (Robert Koch) أولى اللقاحات.
1900	اليابان: استعمل جوكيشي تاكامين (Jokichi Takamine) أنزيم الألفا-أميلاز (α-amylase) لتفكيك النشاء.
1906	ألمانيا: استعمل أوتوروهام (Otto Roehm) التريبسين (trypsin) البنكرياسي في المنظفات ودباغة الجلود.
1916	المملكة المتحدة: طور حاييم وايزمان (Chaim Weizmann) عملية تخمير للأسيتون (acetone) والبيوتانول (n-butanol) .
منذ 1920	صناعة حمض الليمون (citric acid) عن طريق التخمير السطحي باستعمال الفطر Aspergillus niger.
1928-1929	المملكة المتحدة: اكتشاف ألكسندر فلمنغ (Alexander Fleming) للبنسلين (penicillin).
1943	الولايات المتحدة: اكتشاف سيلمان ويكسمان (Selman Waksman) للستربتومايسين (streptomycin) .
منذ 1949	الولايات المتحدة: التحولات الميكروبية للستيرويدات (steroids) على مستوى صناعي.
منذ 1957	اليابان: إنتاج حمض الغلوتاميك (glutmic acid) صناعياً عن طريق التخمير بالحوض باستخدام بكتيريا Corynebacterium glutamicium.
منذ 1960	الدانمارك: استعمال أنزيمات البروتياز (proteases) لدى بكتيريا من جنس Bacillus في المنظفات.
منذ 1965	الدانمارك: استعمال منفحة التجبين - مادة الرنيت- (rennet) البكتيرية لإنتاج الجبن.
منذ 1970	الولايات المتحدة: إنتاج الشرابات العالية بنسبة الفروكتوز (fructose) بالتقانة الأنزيمية لتحل محل السكروز (sucrose) في المرطبات.
1972-1973	الولايات المتحدة: طوّر ستانلي كوهن (Stanley Cohen) وفرانسيس بوير (Francis Boyer) وسائل تأشيب الـDNA (recombination) في الزجاج (in vitro) باستعمال النواقل البلازميدية (plasmid vector).
1975	المملكة المتحدة / سويسرا: حضّر سيزار ميلتزن (César Milstein) وجورج كوهلر (Georges Koehler) أجساماً مضادة وحيدة النسيلة (monoclonal antibodies) باستعمال خلايا ورمية مهجنة (hybridoma cells).
منذ 1977	إمكانية تصنيع بروتينات مأشوبة (recombinant) عن طريق التخمير باستعمال البكتيريا.
منذ 1982	أولى النباتات المقاومة لمبيدات أعشاب، والحيوانات (تعطيل الجين (knockout) المحوّرة .
1985	الولايات المتحدة: اكتشف كاري موليس (Kary Mullis) تفاعل البوليميراز التسلسلي (PCR).
منذ 1990	الولايات المتحدة: بدء مشروع الجينوم البشري (HIGO) .
1995	تسجيل البندورة المحورة (Flavr Savr) كغذاء في الولايات المتحدة والمملكة المتحدة.
منذ 1995	تجارب العلاج الجيني (gene therapy) على الإنسان.
1996	سلسلة كامل جينوم الخميرة.
1996	النعجة دوللي (Dolly) أول حيوان مُستنسخ وهي نسخة عن الأم.
1998	أكثر من 2 بليون زوج قاعدي (base pair) مخزنة في قاعدة بيانات سلسلة الـDNA .
1999	إتمام سلسلة جينوم الذبابة (Drosophila) الذي يبلغ تقريباً 1,8 بليون زوج قاعدي في حوالي 4 أشهر.
1999	إمكانية إبقاء الخلايا الجذعية (stem cells) البشرية في مزرعة.
1999	تجاوز مجموع مبيعات البروتينات العلاجية المأشوبة الـ 10 بليون دولار في السنة.

التقانة الحيوية اليوم (Biotechnoloy today)

الهندسة الوراثية وتقانة الخلية (Genetic Engineering and Cell Technology). لقد كان ستانلي كوهن (Stanley Cohen) وفريدريك بوير (Frederick Boyer)، عام 1973، في سان فرانسيسكو أول من قاما بالتعبير عن جين مصمّم غريب داخل كائن حي مضيف. ثم بعد حوالى 10 سنوات، تم تسجيل أول دواء مأشوب (recombinant)، وهو السوماتوتروبين (somatotropin) البشري. ومنذ ذلك الحين، جرى تسجيل أكثر من 50 بروتيناً تمت هندسته وراثياً كعوامل علاجية، بما في ذلك الإنسولين (للسكري) والإريثروبويتين (erythropoietin) (لمرضى فقر الدم) والعامل VIII (للمصابين بالناعور (hemophiliacs)) والإنترفيرون (β-interferon) (لمرضى التصلب اللويحي (multiple sclerosis patients))، بالإضافة إلى مئات أخرى في مرحلة التطوير. وعلى الرغم من أن هذه التقانة الجديدة تم تطبيقها أولاً في المجال الطبي، إلا أن تأثيرها في الزراعة وإنتاج الغذاء بدأ يظهر بعد ذلك بقليل. فقد جرى تربية وتأصيل (breeding) محاصيل محورة (transgenic) مقاوِمة لمبيدات الأعشاب، أو الحشرات أو الفيروسات، وهي تزرع اليوم بشكلٍ رئيسي في أمريكا الشمالية.

كما عُدِّلت الأزهار وراثياً لكي تعطي ألواناً جديدة، والخضار والفاكهة لكي تحمل صفات غذائية أفضل، والأخشاب لكي تحتوي على ليغنين (lignin) أفضل، وبالتالي تحسين إنتاج الورق. وكذلك، في مجال الصناعة الكيميائية، يزداد عدد العمليات التي ترتكز على المحفزات الحيوية (biocatalysts) إذ يمكن أقلمة الأنزيمات والكائنات المجهرية وراثياً مع ظروف العملية. إلا أن تركيز التقانة الحيوية حالياً هو على دراسات الجينوم (genomics) وما بعد دراسات الجينوم. لقد طُوِّرت الطرائق التي مكّنت من السَلسَلة السريعة لأكثر من 50 جينوماً ميكروبياً، ولجينوم أول نبتة وحيوان، وفي عام 2001، للجينوم البشري. وبذلك تستعمل هذه المعلومات بكثرة في فهم الأسس الجزيئية للأمراض وفي تطوير أدوية جديدة عن طريق مقاربة الغربلة الموجهة نحو الهدف (target-oriented screening).

فالمقاربات الجديدة مثل دراسة البروتيوم (proteome) وعلم الأحياء البنيوي (البيولوجيا البنيوية) تساهم في فهمنا الأساسي لكيمياء الحياة والأمراض، ولدى استخدام العلاج الجيني (gene therapy) فإننا نحاول استبدال الجينات المقصرة في أداء وظيفتها بجينات صحيحة. لذلك فإن هذه التطورات هي مواكبة للتقدم الكبير في علم الأحياء الخلوي (البيولوجيا الخلوية)، الذي يركز على التفاعلات المعقدة للخلايا في الكائن الحي عديد الخلايا، وما هندسة الأنسجة، التي هي مقاربة عملية لترميم الأنسجة المجروحة، وبيولوجيا النظم، وهي مقاربة تعتمد على الحاسوب في فهم الوظيفة الخلوية، إلا تطبيق في هذا المجال.

تقبل العامة: النعجة دوللي (Dolly)، التي ولدت عام 1998، وهي الحيوان الأول الذي تم استنساخه من خلية جسمية (somatic cell)، وبالتالي فهي مماثلة لأمها. لقد أدى اقتحام مثل هذه التطورات على صعيد التلاعبات الجينية مثلاً أو البصمة الوراثية الفردية وتبعاتها الممكنة إلى نقاش متعاطف بين العامة، مثلاً: في أية مرحلة تبدأ الحياة البشرية؟ هل نقبل باستنساخ البشر؟ إلى أي مدى يمكن أن نقبل بالمعاينة الجبرية للكشف عن الأخطار الصحية الفردية، مثلاً، من قبل رب العمل أو شركة تأمين؟ كيف ستؤثر الوراثة الجزيئية (molecular genetics) والمعالجة الجينية (gene therapy) في توزع الأعمار في مجتمعاتنا؟ هل التحوير الوراثي للنباتات والحيوانات أخلاقي أساساً؟ وإلى أي مدى تنسجم هذه التلاعبات مع النظام البيئي وتنوعه الطبيعي؟ كيف ستؤثر التقانات الحيوية الحديثة في العلاقة بين الاقتصاديات المصنعة والمتطورة؟ حتى الآن لم يحل أي من هذه الأسئلة تماماً، ومع اقترابنا من حدود أخرى وهي الفهم الوظيفي لآلية الدماغ البشري، ستصبح الإجابة عن هذه الأسئلة ملحةً أكثر وأكثر على مستوى العالم.

الأسواق (Markets): على مدى العقود القليلة الماضية، كانت الأدوية الجديدة، التي تتزايد نسبتها في السوق إما بروتينات بشرية مأشوبة أو أدوية استُخدمت في إنتاجها، أهداف خلوية مأشوبة (recombinanat). إن وسائل التشخيص الطبية ستصبح أكثر اعتماداً على معلومات الجينوم لدى الفرد، كما سيحدث في النهاية لعلم الأدوية (pharmacology) (دراسات الجينوم الدوائية (pharmacogenomics)). وفي مجال تربية وتأصيل (breeding) الحيوانات والنباتات التي هي أساس إنتاج الغذاء، تلعب دائماً عمليات التربية والتأصيل القائمة على الواسمات الوراثية (genetic markers) دوراً متزايداً، إذ إن الهندسة الوراثية تغدو أكثر سهولة من خلال سَلسَلة الجينوم. كما أنه، ومنذ زمن بعيد أخذ حجم أسواق المنتجات التي يجري الحصول عليها بصورة كبيرة من خلال تقانة الهندسة الوراثية الأهمية الاقتصادية لمنتجات التخمر التقليدية مثل الأحماض الأمينية أو مضادات الحيوية (antibiotics)، يبدي، كما هو متوقع، نمواً أسرع.



بيانات السوق لبعض المنتجات الحيوية (تقديرات العام 2000)

	الحجم	القيمة (€)	السعر / kg
البيرة	130000000 طن	330 بليون	2.50 €/kg
الإيثانول (ethanol)	19000000 طن	5 بليون	0.25 €/kg
حمض الغلوتاميك (glutamic acid)	800000 طن	800 مليون	1.00 €/kg
حمض الليمون (citric acid)	700000 طن	700 مليون	1.00 €/kg
أنزيم البروتياز في المنظفات (protease)	100000 طن	300 مليون	3.00 €/kg
أسبارتام (aspartame)	10000 طن	50 مليون	5.00 €/kg
سيفالوسبورين (cephalosporins)	5000 طن	2,5 بليون	500.00 €/kg
تتراسيكلين (tetracyclines)	5000 طن	250 مليون	50.00 €/kg
أنسولين (insulin)	8 طن	1 بليون	125.00 €/kg
اريثروبويتين (erythropoietin)	10 kg	4 بليون	500 000 000 €/kg

■ تقانة الغذاء الحيوية

● الطعام المخمر (Fermented food)

عموميات (General). في جميع حضارات الانسان، هناك الكثير من الأطعمة التي جرى تعديلها بالتخمير الميكروبي. في البداية، تطورت المهارات التقليدية بهدف حفظ الغذاء. وبالتالي أصبح بالإمكان؛ إطالة أمد القيمة الغذائية للخضروات بخفض درجة الرقم الهيدروجيني (pH) من خلال تشكل الأحماض العضوية (الـ sauerkraut[1] والمخللات)، وتعزيز قابلية هضم الأطعمة من خلال التحلل الأنزيمي قُبيل التخزين (العجين المتخمر (sourdough)، النقانق (sausages) والطمبة (tempeh))، وتحسين الطعم (منتجات الحليب المتخمرة) أو تحضير المنكهات (صلصة الصويا والميسو miso). وفي البلدان الصناعية، هناك حوالى ثلث الأطعمة هي معدلة بالتخمير، وذلك عادةً باستخدام مزارع ميكروبية محددة كبادئاتٍ (starter) للتخمير.

مزارع بادئات التخمير (Starter culture)، وهي متوفرة بكثرة في الصناعات الغذائية لتصنيع مدى واسع من الأطعمة المخمرة. تلعب هذه البادئات دوراً حيوياً في تصنيع منتجات الحليب المتخمرة (كالألبان والأجبان)، وفي إنتاج الخبز من العجين المتخمر (sourdough) (بادئات) والمخبوزات الأخرى (خميرة الخبازين)، وفي صناعة البيرة والنبيذ (خمائر البيرة). وهي يمكن أن تصنف إلى مزارع سلالات منفردة، ومزارع فصائل (أنواع) منفردة، ومزارع مختلطة. أما المعايير الأساسية للمزرعة البادئة فتضم إنطلاقاً سريعاً وموثوقاً لعملية التخمير، تصنيع المنتجات المرغوبة بصورةٍ موثوقة، ومقاومة مضادات الحيوية (antibiotics) والعاثيات (phages). تبلغ قيم إنتاج مزارع البادئات مستوى الـ 100 مليون دولار أمريكي.

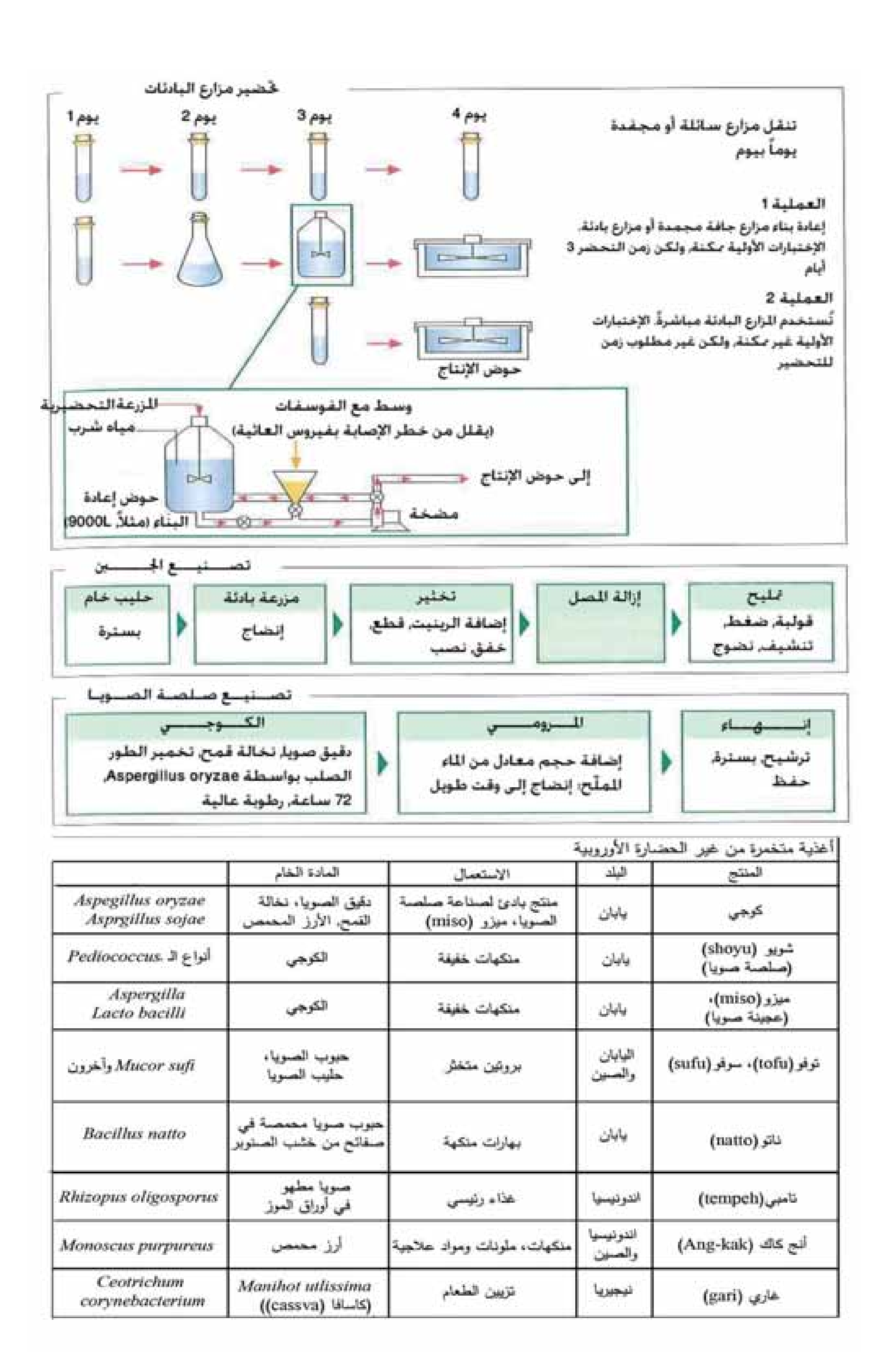
النقانق (Sausages) أو السجق. تنتج أنواع السجق التي يمكن تخزينها بدون تبريد في أغلب الأحيان بإضافة مزارع بادئة من الـ staphylococci (*Staphylococcus carnosus*)، كما تستخدم أيضاً سلالات الـ *Lactobacilli* والـ *Penicillium*. ففي تشكل السجق يُنتَج حمض اللبن (lactic acid) من خلال تخمر الغلايكوجين (glycogen) المخزن في أنسجة العضلات، ما يؤدي إلى تخفيض الرقم الهيدروجيني (pH) إلى أقل من 5؛ وتبعاً لذلك، يُحفظ اللحم من التلوث بالكائنات المجهرية الحساسة للحموضة، كما يصبح بروتين العضلات (نقطة التوازن الكهربائي pH 5.3) هلامياً. تلعب المستقلبات (metabolies) الناتجة من تفكك الدهون والبروتينات بالتخمير دوراً هاماً في نكهة السجق. وتضم الزرعات البادئة الثابتة للملوحة التي يجري استخدامها لإنتاج اللحوم المملحة والسجق (الذي يُحفظ بإضافة الملح، أو النيترات (nitrate) أو النيتريت (nitrite)) كلاًّ من الـ *Staphilococcus* والـ *Lactobacilli*.

الجبن: أنتج في العام 1999 ما يعادل 15,7 مليون طن من الأجبان، منها 6,8 مليون طن في دول الاتحاد الأوروبي و3,8 مليون طن في الولايات المتحدة الأمريكية وحدها. هناك أكثر من 1000 صنف من الأجبان الأوروبية. يبدأ تصنيع الجبن إما بالإصابة التلقائية بالميكروبات البادئة (starters) للتجبين، أو بإضافة مزارع هذه البادئات إلى خثارة اللبن (crud) (التي تُحضَّر بالترسيب من اللبن الحامض (sour milk)، بإضافة منفحة التجبين ـ الرينيت ـ (rennet) أو الكيموسين المأشوب (recombinant chymosine) وإزالة المصل). ويستعمل عدد كبير من أنواع الكائنات الحية في هذه العمليات، التي غالباً ما تكون من الـ Penicillinium (لإنتاج أجبان الـ Roqueforts والـ Camemberts) أوالـ Streptococcus (لإنتاج جبنة Emmentales) أو الـ Actococcus (لإنتاج جبنة Gouda). وتختلف كثيراً أجبان الـ Craft التقليدية تبعاً لمصدر الحليب (بقر، ماعز، غنم) وعملية التصنيع (هوائية، لاهوائية، هوائية ـ لاهوائية) وكيفية إضافة الزرعات البادئة (على السطح أو بالتلقيح (inoculation)).

المنتجات المخمرة غير الغربية: Ang-kak هو «أرز أحمر» يُنتج في الصين بتلقيح الأرز الرطب بأبواغ *Monascus purpureus*. وهو يستعمل كمنكِّه، وأيضاً كمساعد علاجي على الهضم لما يحتويه من مضادات الحيوية (antibiotics). الكشك (Kishk) وهو طبق جانبي آسيوي يحضر من تخمير القمح المنبت بإضافة اللبن الحامض (sour milk). الـ Miso وهو منكِّه ياباني يحضر بإضافة فطر الـ *Aspergillus oryzae* إلى الأرز المُبَخَّر. صلصة الصويا وهي بروتين مُحَلَّل عالي النكهة، يحضر منذ أكثر من 1000 عام في الصين، أما اليوم فهو يُصنَّع من مزيج فول الصويا والقمح الذي يتم تلقيحه بـ *A.oryzae* بتوفر رطوبة مرتفعة وحرارة 35°C لتتشكل الزرعة على السطح، بعد ذلك يجري خلطها بحجم مماثل من الماء المالح (أكثر من 13٪ ملح)، حيث يُخمَّر الهريس المتشكل (*moromi*) لمدة عام على حرارة الغرفة بوجود بكتيريا حمض اللبن (lactic acid bacteria) والخميرة. وفي أندونيسيا وماليزيا يصنع الغذاء الرئيسي «tempeh» بتخمير فول الصويا والأرز المبخَّرين بواسطة *Rhizopus oligoporus*.

---

(1) الـ sauerkraut: طعام معدّ من كرنب مخلّل.



أغذية متخمرة من غير الحضارة الأوروبية

المنتج	البلد	الإستعمال	المادة الخام	
كوجي	يابان	منتج بادئ لصناعة صلصة الصويا، ميزو (miso)	دقيق الصويا، نخالة القمح، الأرز المحمص	*Aspegillus oryzae* *Asprgillus sojae*
شويو (shoyu) (صلصة صويا)	يابان	منكهات خفيفة	الكوجي	أنواع الـ *Pediococcus*
ميزو (miso)، (عجينة صويا)	يابان	منكهات خفيفة	الكوجي	*Aspergilla* *Lacto bacilli*
توفو (tofu)، سوفو (sufu)	اليابان والصين	بروتين متخثر	حبوب الصويا، حليب الصويا	*Mucor sufi* وآخرون
ناتو (natto)	يابان	بهارات منكهة	حبوب صويا محمصة في صفائح من خشب الصنوبر	*Bacillus natto*
تامبي (tempeh)	اندونيسيا	غذاء رئيسي	صويا مطهو في أوراق الموز	*Rhizopus oligosporus*
أنج كاك (Ang-kak)	اندونيسيا والصين	منكهات، ملونات ومواد علاجية	أرز محمص	*Monoscus purpureus*
غاري (gari)	نيجيريا	تزيين الطعام	*Manihot utlissima* ((cassva) كاسافا)	*Ceotrichum* *corynebacterium*

الطعام وتخمر حمض اللبن

(Food and lactic acid fermentation)

عموميات (General). لقد توارثت مئات الأجيال مهارات إنتاج كلٍّ من منتجات الحليب المتخمرة والـ sauerkraut من الملفوف المخمر، وكذلك مهارات تعزيز قابلية هضم الشمندر كعلف حيواني بالتخمير (silage). في عام 1856، وضع لويس باستور (Louis Pasteur) أسس الاستثمار التقاني لهذه العادات عند اكتشافه بكتيريا حمض اللبن. فقد وجد أن تخمر حمض اللبن في المنتجات الغذائية يخفض الرقم الهيدروجيني (pH) إلى قيمة 4 ما يحمي من الإصابة بمعظم الكائنات المجهرية الأخرى.

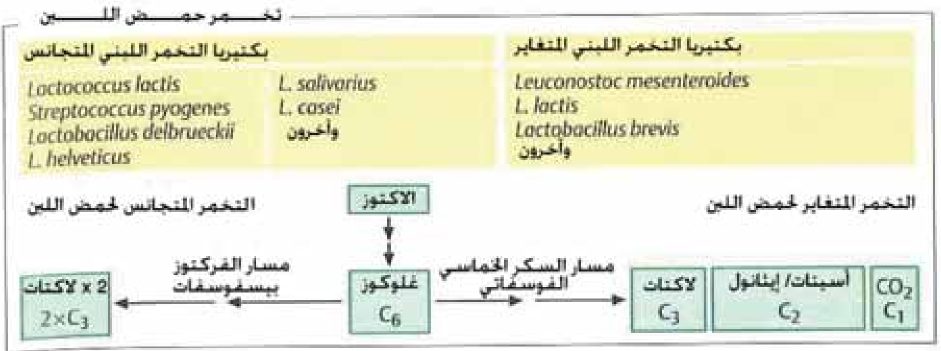
بكتيريا حمض اللبن (Lactic acid bacteria) هي بكتيريا تختلف في أشكالها، ولكن يمكن توصيفها جيداً على أساس خصائصها الوظيفية والكيميائية الحيوية: فهي موجبة الغرام (gram positive)، لا هوائية اختيارياً (facultative anaerobic). وعلى الرغم من أنها تفتقد بروتينات الـ «heme» مثل أنزيم الكاتالاز (catalase) فإنها تستطيع أن تنمو بوجود الأكسيجين. تستطيع هذه البكتيريا أن تفكك اللاكتوز (lactose) إلى غلوكوز (glucose) وغالاكتوز (galactose) وأن تستقلب (metabolize) هذه السكريات إلى حمض اللبن. تكوِّن بكتيريا «التخمر المتجانس» من الـ Lactobacillus كالـ *Streptococcus pyogenes* والـ *Lactobacillus casei* والـ *Lactococcus lactis* مولَيْن 2 (moles من حمض اللبن لكل مول غلوكوز، أما بكتيريا الـ Lactobacillus ذات «التخمر المتغاير» مثل (Leuconostoc mesenteroides و *Lactobacillus brevis* فتكوِّن مولاً واحداً فقط لكل مول غلوكوز. يعتمد مقدار ما يتشكل من L-(+) Lactic acid (عادة 50 ـ 90٪)، D-(-) Lactic acid أو D، L-lactic acid على وجود الأنزيم النوعي بالفصائل من راسيماز اللاكتات (species-specific lactate racemase). وإضافة إلى حمض اللبن، تحتوي منتجات الحليب المتخمرة بروتينات متحللة جزئياً من دون وجود لاكتوز وميكروبيات حميدة؛ لذا تعتبر هذه المنتجات ذات قيمة عالية في غذاء الإنسان.

منتجات الحليب المخمرة (Fermented milk products). يشكل اللبن الحامض (sour milk) والقشدة الحامضة واللبن الرائب والمشروب الفوارالمسمى بالـ Kefir والمخيض (buttermilk) (أقل من 1٪ دسم) أكثر هذه المنتجات أهمية في أوروبا، وهي يمكن أن تتشكل تلقائياً من الكائنات المجهرية الطبيعية الموجودة في الحليب غير المعالج. أما في الإنتاج التجاري لمنتجات الألبان حيث يكون الحليب مبستراً، فتصنع هذه المنتجات بإضافة الزرعات البادئة للتخمير. ينتج من التخمير اللاحق تكوُّن حمض اللبن (lactic acid) والتحميض إلى رقم هيدروجيني (pH) 4 ـ 5. ويُعَد اللبن الرائب الذي يحتوي على أكثر من 95٪ L-(+) lactic acid، بإضافة، على سبيل المثال، مزارع بادئة من الـ *Lactobacillus acidophilus* مع إمكانية تزويدها بالبكتيريا اللاهوائية بشكل كامل *L.bifidus* (strictly anaerobic) (التي تم العثور عليها في فلورا (flora) أمعاء لدى أطفال الرضاعة الطبيعية)، سهل الهضم كما يقوم بتنشيط الجهاز المناعي. والميزة الأخرى للبن المخمر هي في تشكيل المنكهات بفعل أنزيمات البروتياز (protease) والليباز (lipase) الموجودة في الزرعة البادئة للتخمير، حيث تشكل الـ *Streptococci* والـ *Lactobacilli* والـ *Leuconostoc* السلالات البكتيرية ذات الأهمية الخاصة في هذا التأثير، بالإضافة إلى الخمائر في بعض الأحيان.

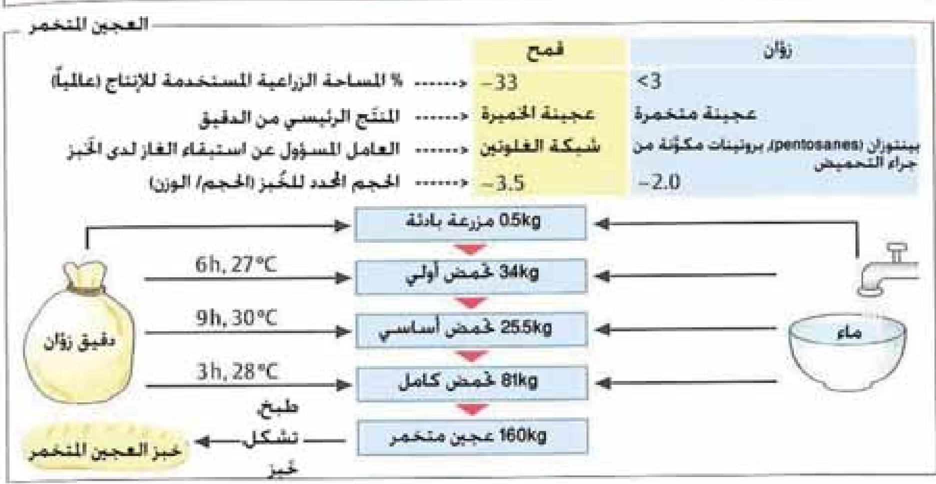
خضروات وفاكهة وعصائر التخمر اللبني (Lactofermentation): تضم الأمثلة الهامة على هذه المنتجات الملفوف المخمّر المسمّى sauerkraut والخيار المخلل. يُنتج الـ sauekraut بملايين الأطنان سنوياً، وتعتمد عملية تصنيعه على التخمر التلقائي لشرائح الملفوف الصغيرة، التي توضع في أوعية خشبية كبيرة (حتى 100 طن)، بواسطة الكائنات المجهرية الطبيعية الموجودة على الملفوف. وبذلك تكون الفلورا الميكروبية (microbial flora) المتشكلة متنوعة جداً، بحيث تضم بكتيريا حمض اللبن، بالإضافة إلى بكتيريا أخرى وخمائر وأعفان. كما أن إضافة الزرعات البادئة هي في طور الدراسة الآن. ومن الأمثلة الأخرى على الخضروات المتخمرة: الـ borscht (شمندر أحمر مخمر؛ روسيا وبولونيا) الـ kimchi (ملفوف صيني مخمر أو فجل مخمر؛ كوريا). أما عصائر الخضروات المتخمرة فهي ثابتة عند التخزين وغنية بالفيتامينات والمعادن ومثالها عصائر الجزر والبندورة.

العجين المتخمر (sourdough): على عكس دقيق القمح، ينتفخ دقيق الزؤان بشكل ملموس فقط عند قيم رقم هيدروجيني (pH) أقل من 4,3 الذي هو شرط لتشكيل التمغط في قشرة (crusts) خبز القمح والزؤان والخبز المقشور الحب والخبز الكامل الحب، وجعله سهل الهضم. ولهذا السبب يحول دقيق الزؤان إلى عجين متخمر مع 4,2 pH من خلال عملية تعتمد على العمل المشترك لبكتيريا حمض اللبن (lactic acid bacteria) وخميرة الخباز (baker's yeast).

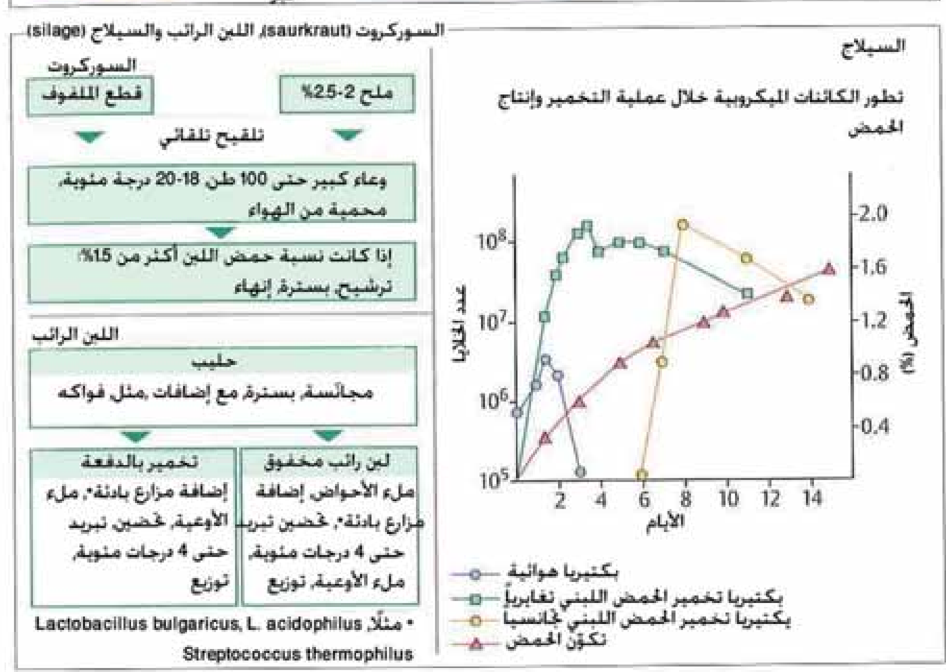
السيلاج (Silage) وهو علف متخمر للماشية في الشتاء، يتكوَّن عادة من الشمندر السكري الذي يجمع في مخازن الغلاّت (silos) أو أكداس تحجب الهواء وتقود إلى التخمر اللبني (lactic acid fermentation). وإذا لم يكتمل هذا التخمر ولم يتشكل حمض اللبن بكميات كافية لخفض درجة الرقم الهيروجيني (pH) عن 5، فإنه يمكن أن تنمو الـ Clostridia التي تلوث العلف. وأغلب الـ silage يحتوي على البكتيريا الممرضة المحبة للبرودة *monocytogenes Listeria* (psycotropic)، التي يمكن أن تتكاثر في الثلاجات مما قد يؤدي إلى تلوث المنتجات الغذائية مثل الأجبان الطرية واللحم المسحوق وسلطة الكرنب (coleslaw) حتى ولو كانت مخزنة تحت درجة حرارة منخفضة.



تخمر حمض اللبن
بكتيريا التخمر اللبني المتجانس
Lactococcus lactis
Streptococcus pyogenes
Lactobacillus delbrueckii
L. helveticus
L. salivarius
L. casei
وآخرون
بكتيريا التخمر اللبني المتغاير
Leuconostoc mesenteroides
L. lactis
Lactobacillus brevis
وآخرون
التخمر المتجانس لحمض اللبن
اللاكتوز
التخمر المتغاير لحمض اللبن
مسار الفركتوز بيسفوسفات
غلوكوز C6
مسار السكر الخماسي الفوسفاتي
2 x لاكتات 2×C3
لاكتات C3
أسيتات/ إيثانول C2
CO2 C1



العجين المتخمر
قمح
زؤان
% المساحة الزراعية المستخدمة للإنتاج (عالمياً)
~33
<3
المنتَج الرئيسي من الدقيق
عجينة الخميرة
عجينة متخمرة
العامل المسؤول عن استبقاء الغاز لدى الخبز
شبكة الغلوتين
بينتوزان (pentosanes)، بروتينات مكوّنة من جراء التحميض
الحجم المحدد للخُبز (الحجم/ الوزن)
~3.5
~2.0
0.5kg مزرعة بادئة
6h, 27°C
34kg تحمض أولي
9h, 30°C
25.5kg تحمض أساسي
3h, 28°C
81kg تحمض كامل
160kg عجين متخمر
دقيق زؤان
ماء
طبخ
تشكل
خبز
خبز العجين المتخمر



السوركروت (saurkraut)، اللبن الرائب والسيلاج (silage)
السوركروت
قطع الملفوف
ملح 2-2.5%
تلقيح تلقائي
وعاء كبير حتى 100 طن، 18-20 درجة مئوية، محمية من الهواء
إذا كانت نسبة حمض اللبن أكثر من 1.5%: ترشيح، بسترة، إنهاء
اللبن الرائب
حليب
مجانسة، بسترة، مع إضافات، مثل فواكه
تخمير بالدفعة
إضافة مزارع بادئة*، ملء الأوعية، تحضين تبريد حتى 4 درجات مئوية، توزيع
لبن رائب مخفوق
ملء الأحواض، إضافة مزارع بادئة*، تحضين تبريد حتى 4 درجات مئوية، ملء الأوعية، توزيع
* مثلاً Lactobacillus bulgaricus, L. acidophilus
Streptococcus thermophilus
السيلاج
تطور الكائنات الميكروبية خلال عملية التخمير وإنتاج الحمض
عدد الخلايا
الحمض (%)
الأيام
بكتيريا هوائية
بكتيريا تخمير الحمض اللبني تغايرياً
بكتيريا تخمير الحمض اللبني تجانسياً
تكوّن الحمض

■ الكحول، الأحماض والأحماض الأمينية

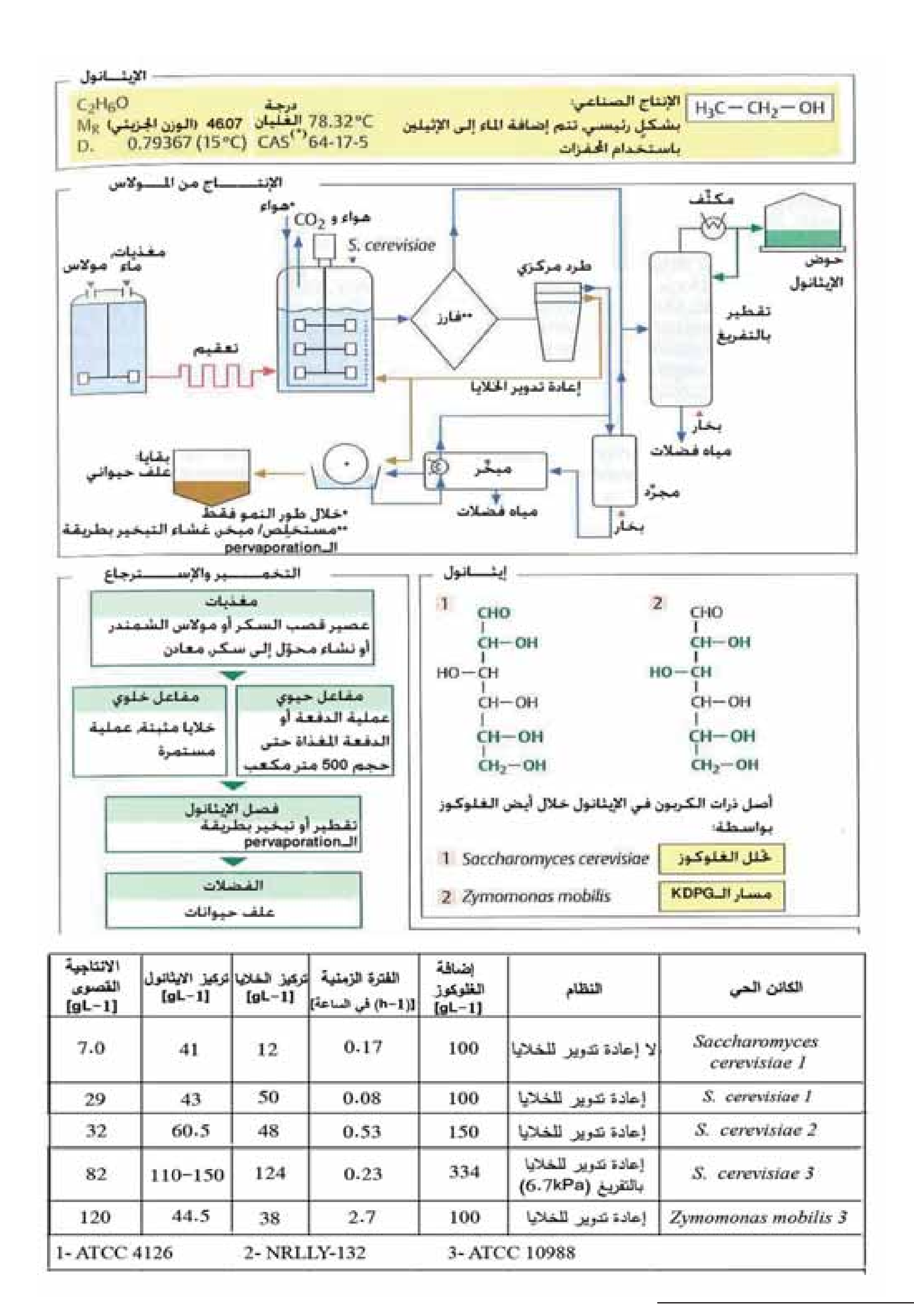
• الإيثانول (Ethanol)

عموميات (General). الإيثانول هو مذيب صناعي هام، ومادة أولية لبناء الكيماويات العضوية ومصدر للطاقة («الكحول الحيوي» «bioalcohol»). لقد أنتج في العام 1997 حوالى 23 بليون ليتر من الإيثانول (18,5 مليون طن)؛ 30٪ تمّ تصنيعه كيميائياً، و70٪ تم انتاجه بالتخمير. يعتبر إنتاج الإيثانول الحيوي (الإيثانول المنتج بيولوجياً (bioethanol)) منافساً من الناحية الاقتصادية، فقط، إذا توفرت أسعار منخفضة جداً من الغلوكوز (أو الكتلة الحيوية)، أو إذا ارتفعت أسعار النفط أو قامت بتنظيمها الحكومة. وبذلك فإن الإيثانول الحيوي يشكل تقانة احتياطية لإنتاج الطاقة، فهو يستعمل في البرازيل والولايات المتحدة الأمريكية كبديل كلي أو جزئي عن بنزين السيارات منذ عام 1975.

الكائنات الحية والتصنيع الحيوي (Organisms and biosynthesis): إن أكثر الكائنات الحية أهمية في إنتاج الإيثانول (ethanol) هي خميرة الخباز (*Saccharomyces cervisiae*). فهي تكوّن، عن طريق تحلل الغلوكوز (glycolysis)، ما يساوي مولين (2 moles) من الإيثانول لكل مول من الغلوكوز. كما تحقق *Zymomonas mobilis*، وهي بكتيريا تم عزلها من الصبار الأمريكي (agaves)، نفس العطاء المولي من الإيثانول إلا أن تصنيعها له يعتمد على مسار ketodeoxyphosphogluconate الأيضي (KDPG metabolic pathway). وحيث إنه لا يستطيع أي من الكائنات الحية هذه تصنيع أنزيمات تفكيك عديدات الساكاريد (polysacharides) كالأميلاز (amylase) مثلاً، فإن الساكاروز (saccharose) أو نواتج التحلل المائي (hydrolysates) للنشاء هي مصدر الكربون المختار. أما إذا كانت عديدات السكاريد هي المصدر الكربوني، فإن ذلك يتطلب عمليات أنزيمية تحولها إلى سكر قبيل تخميرها. لذلك، وكبديل عن هذه الكائنات المذكورة، فقد تم استخدام الخمائر المأشوبة (recombinant) التي تعبر عن أنزيمات تفكيك البلمرة (depolymerization) المناسبة، وبالتالي يمكن أن تحطم النشاء ونصفي السيلولوز (hemicellulose) والسيليلوز. بالإضافة إلى وجود عملية محتملة أخرى تعتمد على بكتيريا *Thermanaerobacter ethanolicus* اللاهوائية المحبة للحرارة، التي تستقلب (metabolize) عديدات السكاريد أو السكريات بالشكل الأمثل على درجة حرارة 70 °C وعلى مدى واسع من الرقم الهيدروجيني (pH) (4,5 ـ 9,5).

عمليات التخمير والاسترجاع (Fermentation and recovery): يجري إنتاج الإيثانول (ethanol) بيولوجياً بنمط الدفعة المغذاة (fed-batch) وباستعمال مفاعلات حيوية (bioreactors) على مستوى كبير تصل سعة الواحد منها إلى 500 m^3 مع خميرة *S.cervisiae*، التي تمثل الكائن الحي المناسب لمثل هذه العمليات، فهي أقل حساسية للتلوث ببكتيريا الـ Lactobacillus من *Zymomonas mobilis*، حتى تحت ظروف غير تامة التعقيم. في هذه العمليات يتم استعمال وسط سكري يحتوي على مصدر للنتروجين من أجل زراعة الخميرة وتنميتها. وبعد فترة نمو هوائية، تُوقَّف التهوئة ليصل إنتاج الإيثانول بعد حوالى 20 ساعة إلى 90٪ من الحد الأقصى النظري. إن ارتفاع تركيز الغلوكوز يؤدي إلى تثبيط (inhibition) عملية التخمير بالكبح الهدمي (catabolite inhibition)؛ لذلك يجري اعتماد نمط التغذية المستمرة أو شبه المستمرة بالسكر (نمط الدفعة المغذاة). وأيضاً، لأن تراكيز الإيثانول المنتج تزيد على 8٪ (التي يتم الوصول إليها عادة بعد 72 ساعة)، وهي بذلك تثبط عمليات الأيض (الاستقلاب metabolism) لدى الخميرة، فإنه تتم إزالة المرق المحتوي على الإيثانول. يجري عادة عزل الإيثانول بواسطة التقطير الصامد للغليان (azeotropic destillation) مما يعطي إيثانول بنسبة 95٪ الذي يمكن استعماله في السيارات. أما الإيثانول الخالص فيمكن تحضيره بالتقطير الاستخلاصي، أو بالغربلة الجزيئية (molecular sieves)، أو بتقانة الأغشية (pervaporation). وفي عدة عمليات مثل عملية Melle-Biont يعاد تدوير الخلايا التي يتم الحصول عليها من الفارز (separator) خلال إزالة المرق وهي يمكن أن تنفع كمزرعة سابقة للدفعة التالية؛ حيث إن هذه الإجراءات تخفض وقت التخمير الإجمالي. وقد طُورت طرق تخمير مستمرة للإيثانول يتم تشغيلها في بعض الأحيان، كما طورت تجارب مفاعلات خلوية باستعمال خميرة أو بكتيريا مثبتة (immobilized) على مواد حاملة وذلك على مستوى تجريبي.

اعتبارات اقتصادية: بالنسبة إلى العمليات الصناعية لتخمر الإيثانول (ethanol)، يستعمل في أغلب الأحيان قصب السكر (البرازيل) ونواتج تحلل (hydrolysates) نشاء الذرة (الولايات المتحدة الأمريكية). وحالياً، هناك حوالى 700 معمل لإنتاج الإيثانول الحيوي (bioethanol) في الولايات المتحدة وحدها. لقد تم إطلاق برنامج «Proalcool» عام 1975 في البرازيل الذي يهدف إلى تخفيض استيراد النفط، حيث تم إنتاج حوالى 12 بليون ليتر/ سنة (2001) من الإيثانول في أكثر من 100 معمل تخمير لمولاس قصب السكر باستعمال التقانة البسيطة (تخمر بالدفعة (batch fermentation)، تقطير). كما أنه تم إنتاج بنزين السيارات المخصّب بنسبة 10٪ بالإيثانول (gasohol) في الولايات المتحدة منذ العام 1975 (عام 2001: حوالى 8 بليون ليتر/ سنة) من نشاء الذرة، إلا أن هذه التقانة تبقى أكثر تطلباً (مثل، الدفعة المغذاة، pervaporation). تُباع نواتج التخمر الصلبة في كلا هذين البلدين (الكتلة الخلوية ومكونات الوسط الصلبة) كأعلاف للحيوانات. إضافةً إلى ذلك، طورت اليابان عدة معامل تحقق إنتاج الإيثانول الحيوي اعتماداً على خلايا الخميرة المثبتة (immobilized).



الكائن الحي	النظام	إضافة الغلوكوز [gL−1]	الفترة الزمنية [(h−1) في الساعة]	تركيز الخلايا [gL−1]	تركيز الايثانول [gL−1]	الانتاجية القصوى [gL−1]
Saccharomyces cerevisiae 1	لا إعادة تدوير للخلايا	100	0.17	12	41	7.0
S. cerevisiae 1	إعادة تدوير للخلايا	100	0.08	50	43	29
S. cerevisiae 2	إعادة تدوير للخلايا	150	0.53	48	60.5	32
S. cerevisiae 3	إعادة تدوير للخلايا بالتفريغ (6.7kPa)	334	0.23	124	110−150	82
Zymomonas mobilis 3	إعادة تدوير للخلايا	100	2.7	38	44.5	120

1- ATCC 4126 2- NRLLY-132 3- ATCC 10988

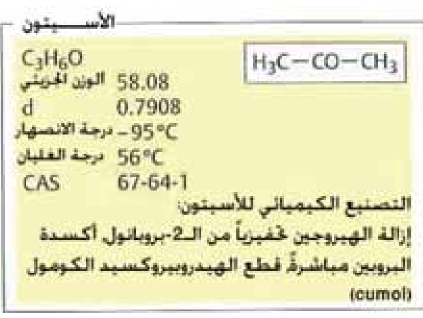
(*) CAS: رقم تسجيل وحيد (لا يتكرر) تعريفي بالعناصر والمواد الكيميائية والبيولوجية والبوليمرات صادر عمّا يعرف بخدمة الملخصات الكيميائية (Chemical Abstracts Service) التابع للجمعية الكيميائية الأمريكية.

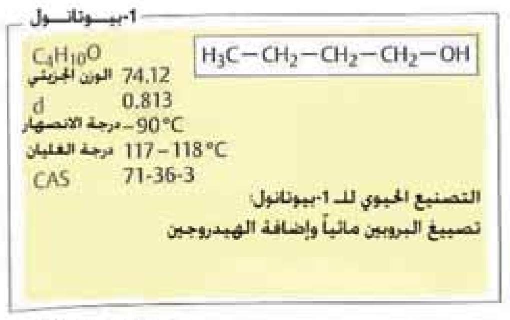
• 1 ـ البيوتانول والأسيتون (1-Butanol, acetone)

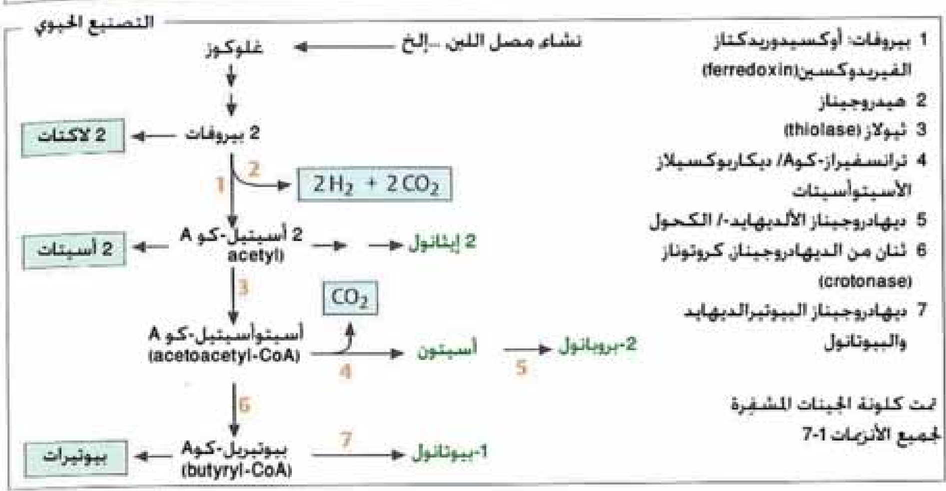
عموميات (General). 1 ـ البيوتانول (ذو إنتاج عالمي يبلغ 1,2 مليون طن/ سنة) هو مذيب مهم لطلاء السيارات ومادة كيميائية أساسية لتشكيل الإستر (ester) (مثلاً، من أجل بيوتيل السليلوز (butyl cellulose)). لقد كان يستعمل بشكلٍ كبير، قبل التقدم في كيمياء النفط، في إنتاج المطاط الصناعيِّ عبر مركب الـ buta-1، 4-diene. كما ويستعمل الأسيتون (ذو إنتاج عالمي يبلغ 3 مليون طن/ سنة) كمذيب أيضاً. لقد بات الطلب كبيراً خلال الحرب العالمية الأولى على إنتاج الكوردايت cordite وهو مادة متفجرة (يدخل الأسيتون في صناعتها) كانت البحرية البريطانية قد استخدمتها. حالياً، يجري إنتاج كلا هذين المركبين، 1 ـ بيتانول والأسيتون، حصرياً من المواد البتروكيميائية الخام، إلا أنه وقبل العام 1950 كان يتم الحصول عليهما عن طريق التخمير باستخدام بكتيريا من جنس الـ *Clostridium* مع النشاء أو المولاس (molasses) كمصدر للكربون، التي هي عملية صناعية قادها عام 1915 الكيميائي الروسي/ البريطاني وحاييم وايزمان (Chaim Weizmann) (الذي أصبح الرئيس الأول لإسرائيل). ونتيجة للتقدم في الوراثة الجزيئية (molecular genetics) وتقانة العمليات فإن إنتاج أي من هذين المذيبين عن طريق التخمير يمكن أن يصبح مرة ثانية أكثر استقطاباً من الناحية الاقتصادية، وبالتالي يجري البحث فيه كتقانة احتياطية.

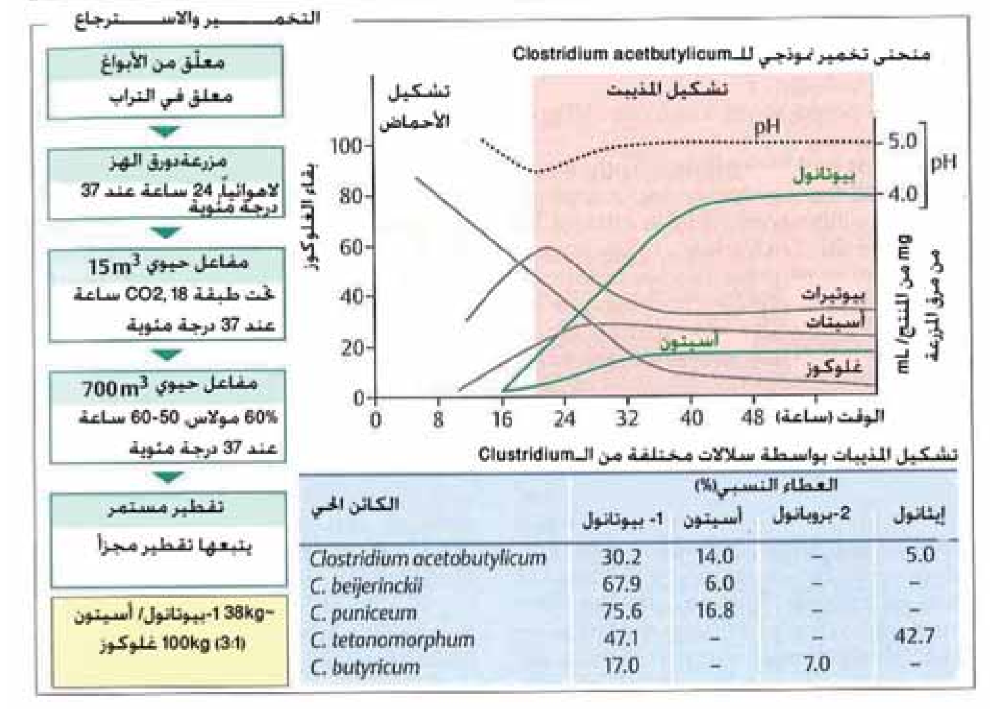
الكائنات الحية والتصنيع الحيوي: من ضمن البكتيريا اللاهوائية (anaerobic) التي تستطيع أن تشكل الأسيتون والـ 1 ـ بيوتانول، يعتبر الجنس *Clostridium* الأكثر أهمية. يحصل خلال عملية التخمير تحول في تشكيل حمض البيوتاريك (buteric acid) وحمض الأسيتيك (acetic acid)) «acetogenesis» (إلى تشكيل البيوتانول وذلك عند نهاية النمو الخلوي الذي يترافق مع انخفاض في قيمة الرقم الهيدروجيني (pH) إلى أقل من 5. يختلف تركيب مزيج الإنتاج من نوع إلى آخر من الكائنات. إلا أن أفضل الدراسات التي جرت على الكائنات الحية كانت تلك التي جرت على البكتيريا *Clostridium acetobutylicum*، التي أبدت أكبر تحمل للمذيبات المتشكلة، السامة للخلايا. فهي يمكن أن تشكل حتى 38g من مركب الـ 1 ـ بيوتانول، بالإضافة إلى مركب الأسيتون بنسبة 3 : 1 باستخدام 100g من الغلوكوز. هناك الكثير من بكتيريا الـ *Clostridium* التي تصنع أنزيمات الأميلاز (amylases) والأميلوغلوكوزيداز (amyloglucosidases) وأنزيمات الهيدرولاز (hydrolases) الأخرى الخارج خلوية (extracellular)، وبالتالي تكون قادرة على أيض (metabolize) مصادر كربون رخيصة مثل النشاء أو اللاكتوز (مصل اللبن) الأكثر استقطاباً من الناحية المادية. كما تمت دراسة الأنزيمات المساهمة في التصنيع الحيوي لهذين المذيبين بصورة جيدة حيث جرى تنسيل (كلونة) جيناتها. يتشكل البيروفات (pyruvate) من الغلوكوز عن طريق تحليل الغلوكوز (glycolysis)، وهو يخضع لعملية نزع كربون تأكسدية (oxidative decarboxylation) بوجود أنزيمات الأكسدة والاختزال لمركبات البيروفات والفيريدوكسين /pyruvate) (ferredoxin oxidoreductase ليتحول إلى acetyl CoA الذي يُختزل إلى عدة مستقلبات؛ ثنائية، ثلاثية أو رباعية الكربون (C_2-، C_3- or C_4-metabolites) باستعمال الـ NADH بشكلٍ رئيسي الناتج من تحلل الغلوكوز. كما يقوم أنزيم الهيدروجيناز (hydrogenase) الموجود أيضاً بنقل بعض من الإلكترونات (electrons) إلى البروتونات (protons) بالإضافة إلى تشكيل الهيدروجين. لقد جرت دراسة تنظيم هذه الأنزيمات بكثافة بغية التأثير في العطاء وفي تركيب المذيبات (هندسة أيضية (metabolic engeneering)). كما جرت سلسلة جينوم *C.acetobutylicum* بشكلٍ كامل، وبالتالي أصبح هذا الكائن الحي يعدّ بأعمال كلّونة، إذ إن مكوك النواقل (shuttle vectors) لـ *E. coli* والـ *B. subtilis*، باستخدام العاثيات (phages) المتخصصة وعوامل التنقل الوراثي (transposons) أصبحت متوفرة. وكذلك يمكن تعزيز العطاء من المذيب بشكل ملموس باستعمال بنى جينية مناسبة لتحويل (transformation) السلالات البرية وسلالات الإنتاج.

عمليات التخمير والاسترجاع (Fermentation and recovery): لقد جرى ولأكثر من 40 عاماً إنتاج الأسيتون والـ 1 ـ بوتانول على المستوى الصناعي باستخدام *C. acetobutylicum* ومخمرات الدفعة ذات حجم يتعدى من 100 m^3. كانت تكاليف مادة الإنتاج تشكل 60٪ من الكلفة الإجمالية، وكلفة الطاقة اللازمة لتقطير المنتج 12٪. أما حالياً، فلا تشكل عمليات الدفعة القائمة على استخدام نشاء الذرة أو المولاس (molasses) كمصدر للكربون، التي استعملت في الولايات المتحدة وجنوب أفريقيا لأكثر من 40 عاماً، منافسة لطرق التصنيع البتروكيميائي. فالمعايير الحاسمة لإعادة استعمال مسار التخمير لإنتاج هذه المذيبات تتمثل في عطاء الناتج من المواد الخام (kg مذيب لكل kg سكر) وإنتاجية العملية (الغرامات من المذيب لكل ليتر في الساعة). وبذلك تهدف التطورات الحديثة إلى 1) إنجاز العملية على مرحلتين مع إعادة تدوير الخلايا، 2) تحقيق عمليات تخمر مستمرة، 3) استخدام كائنات مجهرية مثبتة (immobilized)، و4) تحسين استرجاع المذيبات من وسط التخمير من خلال عمليات الأغشية (pervaporation، التناضح العكسي reverse osmosis). وعلى ذلك، إضافة إلى تطوير سلالات إنتاج متحملة للمذيب، فإن تعزيز العطاءات عن طريق الهندسة الوراثية (genetic engineering) والأيضية (metabolic engineering) وأمثلة هندسة العملية (على وجه الخصوص عمليات الإنتاج اللاحقة) تعتبر جميعها عوامل أساسية لإحياء عملية التخمير هذه الهامة تاريخياً.









تشكيل المذيبات بواسطة سلالات مختلفة من الـ Clustridium

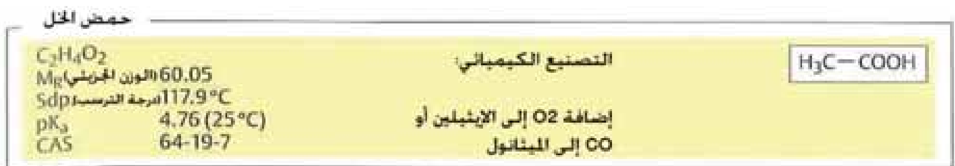
الكائن الحي	العطاء النسبي(%) 1- بيوتانول	أسيتون	2-بروبانول	إيثانول
Clostridium acetobutylicum	30.2	14.0	–	5.0
C. beijerinckii	67.9	6.0	–	–
C. puniceum	75.6	16.8	–	–
C. tetanomorphum	47.1	–	–	42.7
C. butyricum	17.0	–	7.0	–

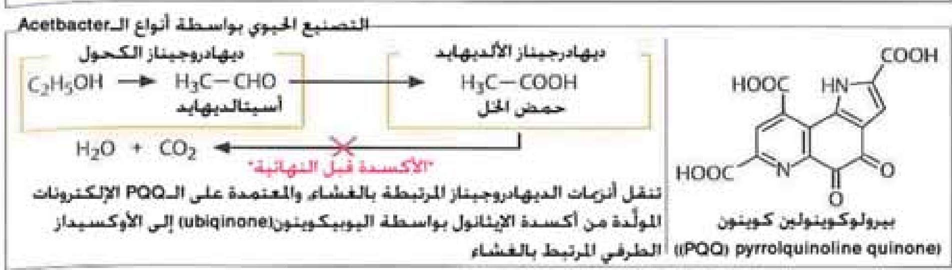
حمض الخل/ الخل (Acetic acid/vinegar)

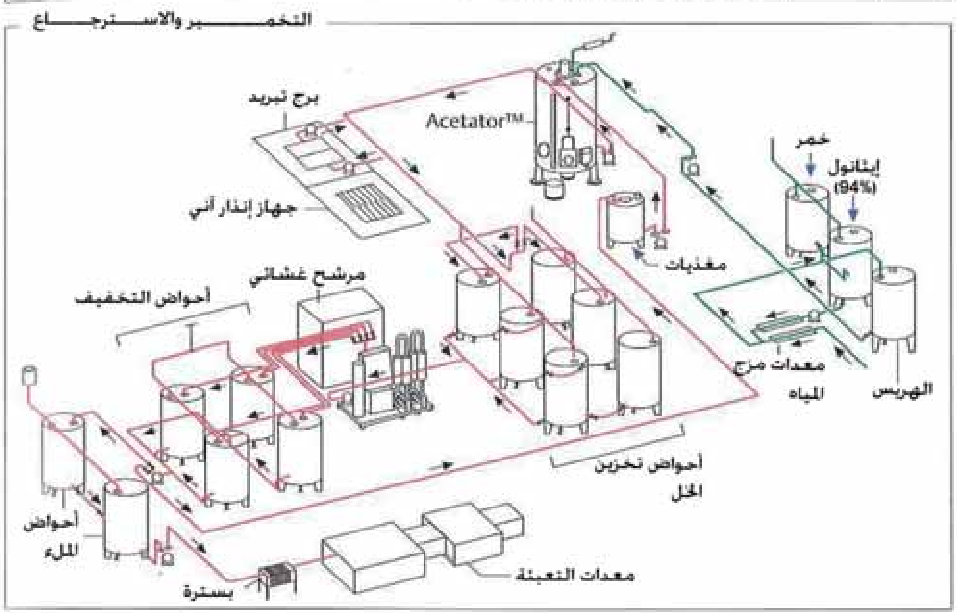
عموميات (General). يستعمل الخل في كثير من الثقافات لتحميض وحفظ الخضار والسلطات والأرز والمنتجات الغذائية الأخرى. واستهلاكه في الأغذية والأشربة المنعشة هو موثق منذ العصور القديمة. لقد كان الخل ولا يزال يُنتج من عصائر الفاكهة المتخمرة مثل النبيذ. في القرن الثامن عشر، تم تطوير «أساليب التثبيت» (immobilization» procedures») في فرنسا حيث يقطر (يُسال) النبيذ المخفف على متفرعة (twiglet) ملوثة ببكتيريا حمض الخل. كما نجح لويس باستور (Louis Pasteur) عام 1868 في تحديد ظروف نمو انتقائية لبكتيريا حمض الخل، واضعاً بذلك مبادئ الإنتاج التقني الحديث للخل. أما الآن، فيجري إنتاج الخل من الإيثانول (ethanol) بالتخمير باستعمال سلالات من الـ Acetobacter، بحيث إذا استعمل النبيذ كمادة أساس يكون الناتج خل النبيذ (محلول يحتوي على 6٪ من حمض الخل في الماء مع رقم هيدروجيني (pH) (4,8)، وإذا استعمل الإيثانول المنقّى يكون تركيز الخل 5٪. يبلغ الإنتاج السنوي للخل في الولايات المتحدة وحدها حوالى 750 مليون ليتر أو ما يعادل 750000 طن. ويعتبر حمض الخل الجليدي (Glacial acetic acid) (99,7٪) مادة كيميائية أساسية هامة، فهو ينتج من الإيثيلين (ethylene) بالأكسدة التحفيزية (catalytic oxidation) ويمتلك pK_a تعادل 5,6. كما اقترحت، في الولايات المتحدة، مادة كالسيوم مغنيزيوم الخل (calcium magnesium acetate) (ذات نقطة انصهار 7.7°C) المنتجة من نشاء الذرة كمضاد تجمد («Nicer De-Icer»).

الكائنات الحية والتصنيع الحيوي (Organisms and biosynthesis): هناك القليل فقط من أنواع الـ Gluconobacter والـ Acetabacter التي يمكنها أكسدة الإيثانول إلى حمض الخل من خلال «الأكسدة قبل النهائية» («Subterminal oxidation»). إن تصنيف هذه الأنواع من البكتيريا معقد نتيجة تغييرها السريع لنمطها الظاهري (phenotype) خلال نموها، لذلك يجرى تصنيفها عن طريق تنميط الـ 16S RNA، ومؤخراً، عن طريق تحديد سيماء البلازميد (plasmid profile) أيضاً. تجري أكسدة الإيثانول من خلال تفاعل تسلسلي لأنزيمات نازعة هيدروجين ـ ديهادروجيناز ـ الكحول (alcohol dehydrogenas (ADH)) ونازعة هيدروجين ـ ديهادروجيناز ـ الألديهايد (aldehyde dehydrogenase (ALDH))، اللذين هما أنزيمان مرتبطان بالغشاء (membrane bound enzymes) ويحتويان على الـ pyrolloquinoline quinine (PAA) كمجموعات مساعدة (prosthetic). كما يحتوي الـ ADH على ثمالة heme C إضافية. تقوم هذه الأنزيمات بنقل الإلكترونات المتولدة عن أكسدة الإيثانول إلى أنزيم الأوكسيداز الطرفي (terminal oxidase) المرتبط بالغشاء من خلال مادة الـ ubiquinone. وخلال نموها، تقوم بكتيريا الـ Acetobacter والـ Gluconobacter بتأييض (metabolize) الغلوكوز إلى بيروفات (pyrovate) عبر كل من تحلل الغلوكوز (glycolysis) أو مسار KDPG وبعدها عبردورة حمض الليمون (cetric acid cycle). كلتا السلالتين البكتيريتين حساستان جداً لنقص الأكسيجين، ويؤدي انقطاعه، حتى لبضعة دقائق فقط، إلى تحقيق نقص ملموس في أكسدة الإيثانول. وإذا استُنفِد الإيثانول، فإن حمض الخل يُؤكسد بشكلٍ إضافي بوجود الأكسيجين إلى ثاني أوكسيد الكربون.

عمليات التخمير والاسترجاع (Fermentation and recovery): من أجل الإنتاج التقني لحمض الخل يُستعمل النوع البكتيري *Acetobacter*، الذي يُنمَّى على هريس من النبيذ السائل أو الإيثانول (ethanol) المنقّى، ومغذيات أخرى مع توفر أكثر من $60gL^{-1}$ من حمض الخل وبوجود تهوية قوية لمنع الأكسدة الإضافية لحمض الخل. تُنفَّذ عملية التخمير باستخدام نمط الدفعة المغذاة تكرارياً (fed-batch): فحينما ينخفض تركيز الإيثانول إلى حوالى 0,2٪ (باستشعار حساس الإيثانول)، تُزال كمية محددة من مرق المخمِّر ويتم استبدالها بهريس جديد نقي. ونظراً إلى الحاجة الماسة للتهوئة المتجانسة (0.1 vvm، 0,1 أحجام هواء لحجم المخمر بالدقيقة)، فإنه يتم استخدام خفاقة تدور وتسكن عالية الفعالية مزودة بمهوي ذاتي (المسمَّى بالـ «Frings Aerator»). يبدأ إنتاج الحمض فوراً مع إنتاج الحرارة التي يتم تخفيضها من خلال المبادِلات الحرارية (heat exchangers). ويبلغ متوسط إنتاجية المفاعل ذي الحجم $100m^3$ باستخدام هذه العملية حوالى 1.6g من حمض الخل لكل ليتر في الساعة. وباستعمال مزارع بادئة (starter cultures) خاصة مع المراقبة والضبط المناسب، فإن هذه العملية بإمكانها أن تعطي حوالى 17,5٪ من حجم المفاعل كمحلول خل خلال 50 ـ 70 ساعة. كما يمكن تحقيق تركيز أعلى من هذا المحلول (حتى 21٪)، وهو ما يكون مطلوباً في صناعة المعلبات، وذلك بإتاحة استمرار عملية التخمير لمدة 45 ـ 55 ساعة. حينما يصل التركيز إلى 20٪ من حمض الخل تموت بكتيريا حمض الخل وتنتهي عملية التخمير. عندئذٍ، يرشح الخل الخام وينقى بعملية الغشاء (membrane process)، وبعدها يبستر ويُخفف إلى محلول خل بنسبة 5 ـ 6٪ حيث يمكن إصداره في السوق. يُنتج حوالى 70٪ من حمض الخل في العالم في أكثر من 700 نظام مفاعل حيوي من هذا التصميم (Fring Acetator). كما أن الأنواع الأخرى لهذه العملية، مثل عملية التخمير المستمرة مع إعادة تدوير الخلايا أو باستعمال بكتيريا حمض الخل المثبتة في المفاعل المزود بمصعد هوائي (airlift bioreactor) بإمكانها أن تعطي في بعض الأحيان إنتاجية أعلى (أكثر من $100gL^{-1}h^{-1}$).







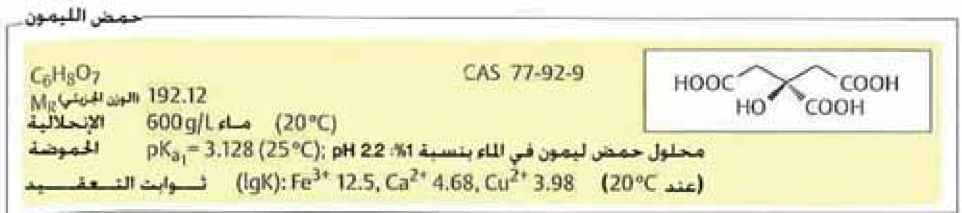
بدائل العملية			
	الإنتاج الأقصى للخل [%]	إنتاجية [L/m3 في اليوم]	ملاحظات
الإجراء القياسي (دفعة متكررة)	15	35-50	مخطط عملية بسيط
إجراء بخطوة واحدة نسبة مئوية عالية	18.5	30-50	تركيز خل عالي تكاليف تخزين ونقل منخفضة
إجراء بخطوتين ونسبة مئوية عالية	>20	30-50	تركيز خل عالي تكاليف تخزين ونقل منخفضة
عملية مستمرة	>10	حتى 60	تركيز خل عالي تكاليف تخزين ونقل منخفضة
بكتيريا حمض الخل مثبتة (تجريبياً)	< 9	–	قعر مسيّل أو مفاعل مزود بمصعد هوائي حتى 460 يوم

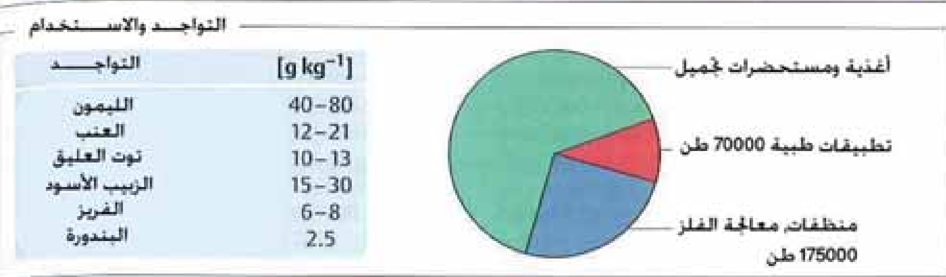
• حمض الليمون (Citric acid)

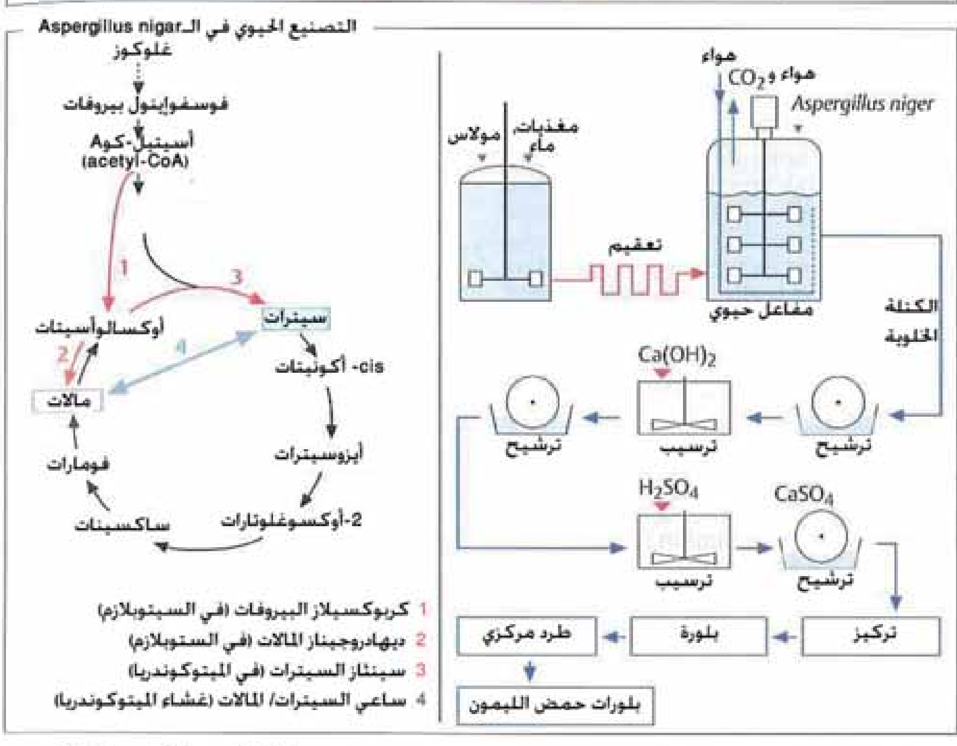
عموميات (General). تم عزل حمض الليمون لأول مرة عام 1822 من عصير الليمون من قبل الكيميائي كارل شييل (Carl Scheele)، الذي قام أيضاً بالدلالة على مكوِّناته. كما يشكل كثير من الفاكهة كميات كبيرة من حمض الليمون. لقد اكتشف هانس كربس (Hans Krebs) في العام 1934 أن حمض الليمون هو مركب مركزي في الأيض الهوائي (aerobic metabolism) (دورة حمض الليمون)؛ فعلى سبيل المثال، يتشكل في عمليات الأيض لدى الإنسان البالغ 1.5 kg من حمض الليمون يومياً كمركب وسيط. إن حمض الليمون هو حمض قوي ثلاثي القاعدة، ذي قيم pK_a 3,13 و4,78 و6,43 (على درجة حرارة 25°C) لمراحل تفككه الثلاث. ويسجل المحلول المكوَّن من 1٪ حمض الليمون قيمة رقم هيدروجيني (pH) 2,2. كما أنه، ومن خلال مجموعات الكربوكسيل (carboxylic groups) الثلاث ومجموعة الهيدروكسيل (hydroxyl) الموجودين في هذا المركب، فإن حمض الليمون هو أيضاً عامل تعقيد (complexing) ممتاز للكاتيونات الثنائية والثلاثية. يتم إنتاج حمض الليمون حصرياً بالتخمير، ويبلغ الإنتاج السنوي منه حوالى 700000 طن (1997)، مع قيمة 700 مليون دولار أمريكي في السوق. وهو يستخدم كمادة محمضة وحافظة في الصناعات الغذائية، وكعامل تعقيد في معالجة المعادن وكملطف (softener) للماء في المنظفات.

الكائنات الحية والتصنيع الحيوي (Organisms and biosynthesis): تقوم بعض الفطريات مثل *Aspergillus niger* بإفراز كميات كبيرة من حمض الليمون خلال وبعد الطور اللوغاريتمي المتأخر، وذلك لدى توفر فائض من الغلوكوز والأكسيجين. وعلى الرغم من أن المركبات الوسيطة في دورة حمض الليمون تُستهلك عادة في عملية الأيض (metabolism) العامة، إلا أنه من الممكن تقريباً تحول مقدار من الغلوكوز إلى حمض الليمون بواسطة *A.niger* وذلك لسببين: تعويض النقص من مركب حمض الأوكسالواستيك (oxaloacetic acid) وهو مادة وسطية في دورة حمض الليمون من خلال التفاعل التصليحي: حيث إن أنزيم كاربوكسيلاز البيروفات (pyruvate carboxylase)، الذي يتموضع في هذا الفطر في السيتوبلازم (cytoplasm)، يحفز إضافة CO_2 إلى البيروفات، ويشكل بالتالي حمض الأوكسالواستيك كطريق مختصر لتحلل الغلوكوز (glycolysis). إفراز حمض الليمون من المتقدرة - ميتوكوندريا - (mitochondria)، مكان تشكله، إلى السيتوبلازم بواسطة أنزيم مضاد الساعي (antiporter)، وهو بدوره يقوم بإدخال حمض الماليك (maleic acid) (المنتج المختزل لحمض الأوكسالواستيك) من السيتوبلازم.

عملية التصنيع (Manufacture process): يستعمل فطر *A.niger* في الإنتاج الصناعي لحمض الليمون من السكريات، حيث إنه لا يزال جزء من هذا الإنتاج يُنفَّذ بالعملية السطحية (أوعية سطحية) التقليدية: وهي باستعمال صواني مقاومة للأحماض في حيز معقم مملوء بالعصارة السكرية ومُلقَّح بأبواغ *A.niger*. بعد خمسة أيام من بدء عملية التصنيع يتشكل على السطح طبقة من الخيوط الفطرية المتشابكة - الميسيليوم - (mycelium) التي تقوم بتخمير السكر. تتطلب هذه العملية درجة عالية من التهوئة (بمعدل تهوئة يصل إلى 10 أحجام من الهواء لكل حجم من المرق في الدقيقة 10vvm) وذلك للتخلص، بشكل رئيسي، من الحرارة المولدة. بعد حوالى ثمانية أيام من التخمير، يتم التخلص من الخيوط الفطرية المتشابكة - الميسيلوم -، واستخلاصها بالمياه الساخنة، كما يجري ترسيب حمض الليمون من السائل المدمج فيه. تتم إزالة الخيوط الفطرية المتشابكة - الميسيليوم - من خلال الترشيح، ويتم ترسيب حمض الليمون من خلال الرشاحة المتشكلة، وذلك بإضافة $Ca(OH)_2$، أما استرجاعه من سترات الكالسيوم Ca-citrate فيتم بالتفاعل مع حمض الكبريت (sulfuric acid). تسمح إضافة الفحم النباتي المفعل (activated charcoal) أو المبادلات الأيونية (ion exchangers) بتبلور حمض الليمون بصورة نقية جداً. يتشكل خلال هذه العملية أكثر من 1 طن من الجص لكل 1 طن من حمض الليمون مما ينتج منه تكاليف عالية لمعالجة المياه العادمة. ويكون العطاء من حمض الليمون في هذه العملية بمستوى الـ 50g لكل kg من السكر. غير أن معظم ما يُنتج من حمض الليمون في هذه الأيام هو باستخدام مخمرات مخفوقة أو مزودة بمصعد هوائي ذات حجم 500-100 m^3. ففي هذه المخمرات تعقم مفاعلات الفولاذ غير القابل للصدأ (stainless steel reactor) (سائل الجني ذي رقم هيدروجيني (pH) يساوي 2,0) بالبخار أولاً، ثم تملأ بمصدر كربون قليل التكلفة مثل نواتج النشاء المتحللة (starch hydrolysates) أو السكروز (sucrose). وبآلية غير مفهومة تماماً، يشجع الحصول على تراكيز مرتفعة من حمض الليمون استخدام أوساط ذات محتوى محدود من الـ Mn^{2+} (تركيز أقل من 2μg/L^{-1} عبر إضافة hexacyanoferrate أو Cu^{2+} أو مبادلات إيجابية الشحنة (cationic exchanger)). يكتمل تشكل الكتلة الخلوية عادة بعد 48 ساعة عند 5 pH، ويضاف السكر عادة بنمط الدفعة المغذاة (fed-batch) مع زيادة التهوية التي تطلق تشكل حمض الليمون الذي يفرز إلى الوسط. في طريقة الإنتاج هذه يكون العطاء من حمض الليمون بمستوى الـ 50٪، كما يجري استرجاعه بنفس الطريقة المذكورة أعلاه. أما الطريقة الحديثة البديلة في الاسترجاع فهي تعتمد على حجز حمض الليمون في مرق التخمر مع الـ trilauryl amine ثم استخلاص هذا المعقد المتشكل بخليط من مذيب الألكان (alkanes) ومذيب الـ 1 - أوكتانول (1-octanol)، حيث يمكن استرجاع المذيبين والحاجز في هذه العملية. وتستطيع بعض الخمائر المحطمة للألكين أن تشكل حمض الليمون إما عن طريق وحدات الألكين الأقل تطايراً أو من الغلوكوز - التي هي نقطة بداية مشوقة لتقانات المستقبل.


حمض الليمون
$C_6H_8O_7$
CAS 77-92-9
HOOC COOH
HO COOH
الوزن الجزيئي M_R 192.12
الإنحلالية ماء 600 g/L (20°C)
الحموضة pK_{a_1} = 3.128 (25°C); محلول حمض ليمون في الماء بنسبة 1%: pH 2.2
ثوابت التعقيد (lgK): Fe^{3+} 12.5, Ca^{2+} 4.68, Cu^{2+} 3.98 (عند 20°C)


التواجد والاستخدام
التواجد [g kg⁻¹]
الليمون 40–80
العنب 12–21
توت العليق 10–13
الزبيب الأسود 15–30
الفريز 6–8
البندورة 2.5
أغذية ومستحضرات تجميل
تطبيقات طبية 70000 طن
منظفات، معالجة الفلز
175000 طن


التصنيع الحيوي في الـAspergillus nigar
غلوكوز
فوسفواينول بيروفات
أسيتيل-كوA
(acetyl-CoA)
أوكسالوأسيتات
سيترات
cis- أكونيتات
مالات
أيزوسيترات
فومارات
ساكسينات
2-أوكسوغلوتارات
1 كربوكسيلاز البيروفات (في السيتوبلازم)
2 ديهادروجيناز المالات (في الستوبلازم)
3 سينتاز السيترات (في الميتوكوندريا)
4 ساعي السيترات/ المالات (غشاء الميتوكوندريا)
هواء
هواء و CO_2
Aspergillus niger
مولاس
مغذيات
ماء
تعقيم
مفاعل حيوي
الكتلة الخلوية
$Ca(OH)_2$
ترشيح
ترسيب
ترشيح
H_2SO_4
$CaSO_4$
ترسيب
ترشيح
تركيز
بلورة
طرد مركزي
بلورات حمض الليمون


التخمير والاسترجاع
مادة تلقيح
وسط
نشاء أو مولاس
مصدر نيتروجيني
أملاح
مخمر البذر
مفاعل حيوي 40 متر مكعب
مفاعل حيوي
من الفولاذ بسعة 400 متر مكعب، 8 أيام عند 32 درجة مئوية. يتحول الـpH بعد النمو الخلوي من 5.0 إلى 2.0
ترشيح
إزالة المسيليوم بالترشيح الدوار تحت التفريغ
تنقية
تنقية، بلورة
1. $Ca(OH)_2$
2. H_2SO_4
3. إعادة بلورة
>200 g/L
حمض ليمون بعد 150 ساعة

• حمض اللبن وحمض الغلوكونيك

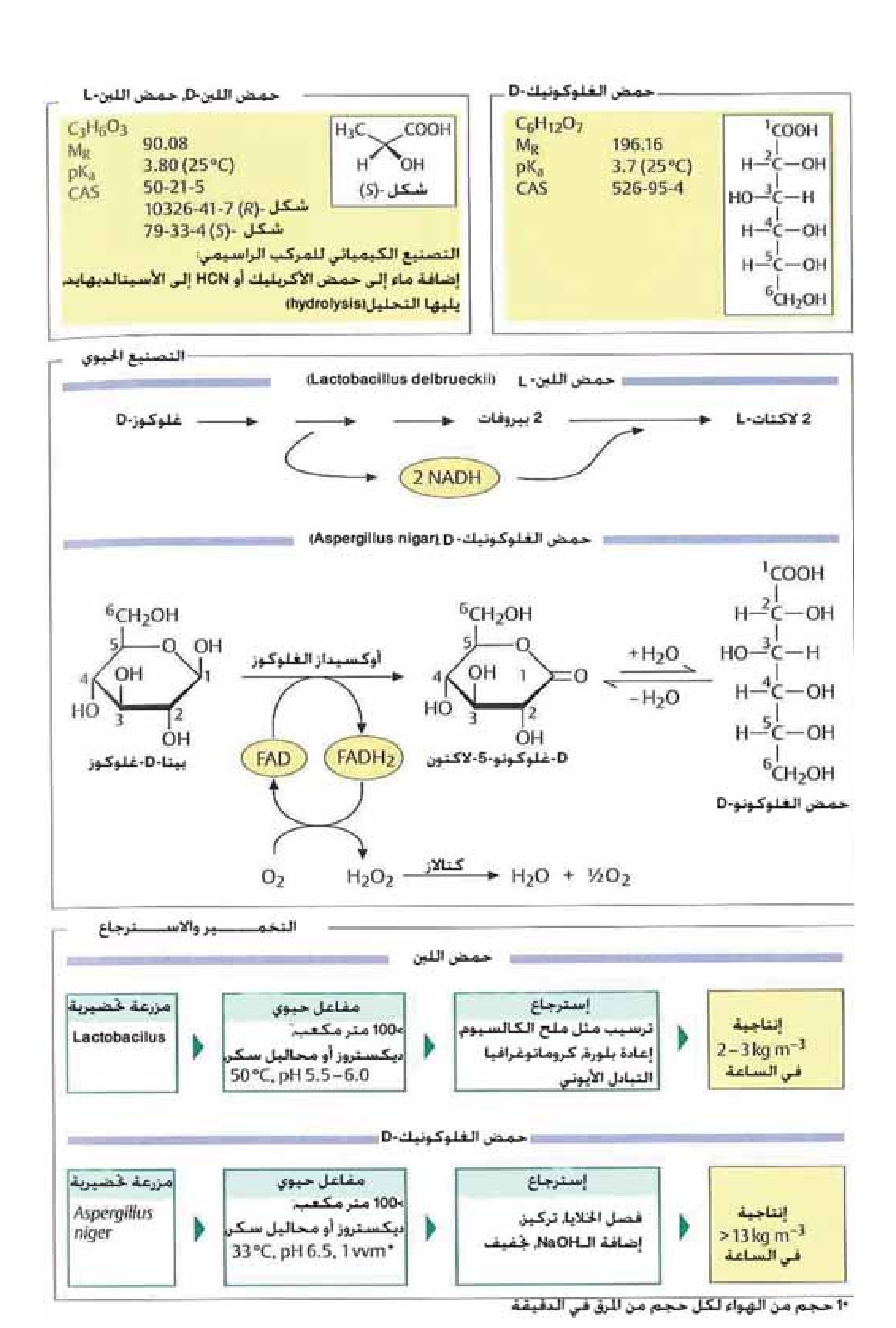
(Lactic acid, gluconic acid)

عموميات (General). يبلغ الإنتاج السنوي لحمض اللبن 50000 طن، منها 30000 طن حمض اللبن ذي الوضعية -L ينتج بالتخمير. يُستعمل حمض اللبن بشكل رئيسي (85٪) في الغذاء والمشروبات وذلك لطعمه الحامضي اللذيذ وخصائصه الحافظة. كما يستعمل، من هذا الحمض، المنتج الأقل نقاوة وذلك في صناعة الجلود والنسيج. هناك تطبيق جديد لحمض اللبن ـ L، وهو استعماله كوحدة بناء كيميائية في تصنيع البولي إستر (polyesters) القابل للتحطيم الحيوي (Nature Works™) فالإنتاج الحالي لبوليمرات متعددة حمض اللبن (polylactides) يبلغ 4000 طن، إلا أنه سيتم قريباً إنتاج 14000 طن/ سنة منه، وذلك من أجل تحقيق تطبيقات للأنسجة وعمليات التعبئة على نطاق واسع. تُنتَج مركبات الـ Na-D-gluconate والـ D-gluconic acid والـ δ-lactone بمستوى الـ 60000 طن؛ حيث يُستعمل δ-lactone في الصناعة الغذائية كمحمض معتدل. ولأن مركبات غلوكونات الكالسيوم (Ca^{2+}-gluconates) والحديد (Fe^{3+}-gluconates) هي شديدة الذوبان وغير سامة، فإنها تستعمل في مستحضرات الحُقَن الطبية لمعالجة عوز الكالسيوم والحديد. وكذلك، إن غلوكونات الصوديوم (Na^{2+}-gluconates) ذي الثباتية القلوية هو عامل تعقيد للكالسيوم والحديد، حوالى 50٪ من إنتاجه يُستخدم في تنظيف الزجاجات وإزالة الصدأ القلوي، كما أنه يُستخدَم في تحضير الأسمنت، ومنع ترسب الحديد في معالجات الأنسجة. وتبلغ قيمة pk_a حمض D-gluconic 3,7.

الكائنات الحية والتصنيع الحيوي (Organisms and biosynthesis): ينتج حمض اللبن ذي الوضعية L- (L-lactic acid) تقنياً من مختلف أنواع بكتيريا الـ Lactobacilli. ويعتمد اختيار نوع البكتيريا على مصدر الكربون المستعمل. ففي حالة تحويل المركب الأولي (substrate) بشكل كامل، يجب استخدام بكتيريا التخمير اللبني المتجانس من الـ Lactobacilli، وذلك لأنها تنتج مولين (2 moles) من حمض اللبن -L لكل مول من الغلوكوز -D خلال عملية تحليل الغلوكوز وعلى العكس، فإن D-gluconic acid هو الناتج النهائي لعملية أكسدة الغلوكوز -D قبل النهائية وهي بذلك تشبه عملية أكسدة الإيثانول قبل النهائية إلى حمض الخل. تقوم بهذا التفاعل المنتِج لـ D-gluconic acid بعض الفطريات *Aspergillus niger*) وأنواع *Pencillium*)، وكذلك البكتيريا المؤكسدة خاصة Gluconobacter؛ حيث إن الأنزيم الفلافوني المسؤول في الفطريات (الأعفان) هو أوكسيداز الغلوكوز ـ D-glucose) -D oxidase)، الذي يقع في جدار خلية الفطر، كما يمكن أن يوجد أيضاً في الوسط خلال التخمير. أما في سلالات الـ Gluconobacter فيُستخدم أنزيم نازعة الهيدروجين ـ ديهادروجيناز ـ من الغلوكوز ـ D (D-glucose dehydrogenase) المرتبط بالغشاء (membrane-bound enzyme) والذي يحتوي على العامل المساعد pyrolloquinoline quinine، وهو ما يشبه أنزيمات نازعات الهيدروجين من الكحول والألدهايد في سلالات الـ Acetobacter.

عمليات التخمير والاسترجاع (Fermentation and recovery): يمكن إنتاج حمض اللبن بواسطة التصنيع الكيميائي أو بالتخمير. في التصنيع الكيميائي، تتم إضافة H_2O إلى حمض الأكريليك، أو HCN إلى الأستلدهايد (acetaldehyde)، فينتج من ذلك حمض لبن راسمي (racemic). أما في التخمير، فيعتمد اختيار الكائن الحي على المصدر الكربوني؛ إذ تُفضل بكتيريا الـ *Lactobacillus delbrueckii* أو *L. leichmannii* في حالة استخدام الدكستروز أو محاليل سكرية أخرى، بينما تُفضل *L. bulgaricus* حينما يكون مصل اللبن هو المصدر الكربوني. يحتوي وسط التخمير على 12 ـ 18٪ سكر، ومصدر للنتروجين، وفوسفات وفيتامينات B. تكتمل عملية التخمير، التي يجري تنفيذها على درجة حرارة 45-50°C تحت ظروف فقيرة بالأكسيجين وبوجود CaCO3 كدارىء (ليبقى الرقم الهيدروجيني (pH) ثابتاً بين 5,5 و6)، بعد 2 ـ 6 أيام، اعتماداً على تركيز المركب الأولي (substrate). وبعد إزالة الكتلة الخلوية، تتحول لاكتات الكالسيوم عبر إضافة حمض الكبريت (H_2SO_4) إلى حمض حر، الذي يمكن أن ينقى إضافياً بواسطة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني، أو، كبديل عن ذلك، يمكن من خلال الأسترة بالميثانول إعطاء حمض لبن ميثيل الإستر الذي يمكن تنقيته بالتقطير. لا يزال حالياً استعمال الأغشية السائلة والاستعمال المباشر للمبادلات الأيونية في مرق التخمير، من دون سبق الترسيب لأملاح الكالسيوم في طور التطوير. ومن أجل حاجات البولي إستر، فإنه يتم تشكيل الـ lactide من خلال التكثيف وبعد ذلك تتم تنقيته بالتقطير تحت تفريغ.

يُحضَّر حمض الغلوكونيك -D (D-gluconic acid) من الغلوكوز -D عبر التأكسد الالكتروكيميائي أو بالتخمير وذلك باستعمال الفطر *A. niger*. يُجمِّع هذا الفطر، عند رقم هيدروجيني (pH) أعلى من 3، أنزيم أوكسيداز الغلوكوز في جداره الخلوي، الذي يقوم بأكسدة الغلوكوز -D إلى -D glucono-5-lactone، وهو الذي بدوره يتحلل تلقائياً أو بصورة أسرع من خلال التحفيز الأنزيمي (أنزيم اللاكتوناز) إلى حمض الغلوكونيك -D (D-gluconic acid). ويتم الحصول على غلوكونات الصوديوم أو الكالسيوم (-Na، Ca-gluconate) عند تنمية الكتلة الخلوية على pH 4,5 ـ 6,5 (دارئاً من Na_2CO_3/ NaOH أو $CaCO_3$) بإضافة 11 ـ 25٪ غلوكوز -D تحت تهوية شديدة. كما يتم الحصول على الملح من رشاحة مرق التخمير عن طريق التركيز والتجفيف، بعد ذلك، وللحصول على الحمض الحر واللاكتون من الملح فإنه يجري استخدام كروماتوغرافيا التبادل الأيوني.



*1 حجم من الهواء لكل حجم من المرق في الدقيقة

الأحماض الأمينية (Amino acids)

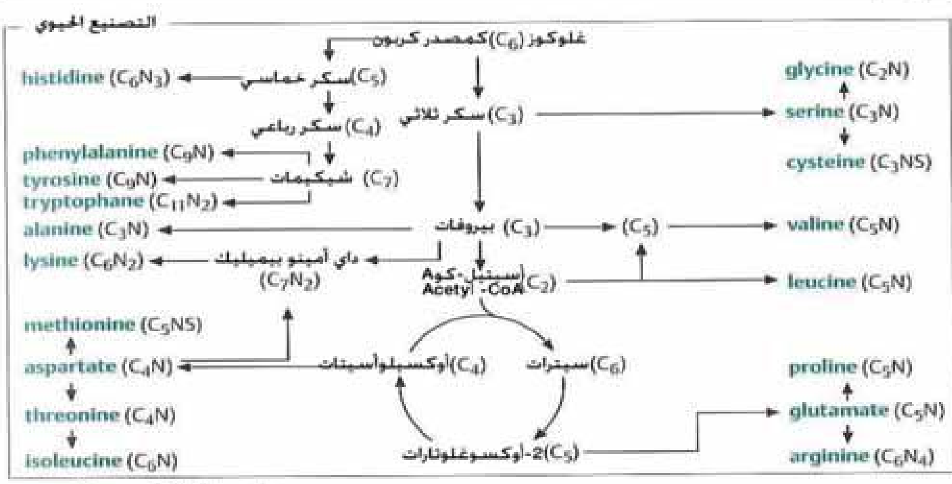
عموميات (General). لقد استعملت الأحماض الأمينية لأغراض طبية، مثلاً، في مستحضرات الحقن الطبية، وذلك منذ اكتشاف دورها الأيضي الهام في النصف الأول من القرن العشرين. إن بعض الأحماض الأمينية، مثل D ،L- methionine، وL-lysine أو L-threonine تستخدم كمضافات إلى العلف الحيواني. لقد ساعد اكتشاف خصائص تحسين الطعم في الغذاء لدى الحمض الأميني L-glutamate، وثنائي الببتيد AspartameTM، كمحلي ممتاز منخفض السعرات الحرارية، على إطلاق الإنتاج الصناعي للأحماض الأمينية. إن الأحماض الأمينية العشرين المولدة للبروتينات (proteogenic) هي وحدات بناء البروتينات والببتيدات، إذ تعتمد معظم الكائنات الحية الأكثر تطوراً في حصولها على عدة أحماض أمينية (الأحماض الأمينية الأساسية) على ما تتناوله من بروتينات في غذائها. وتضم هذه الأحماض الأمينية الأساسية بالنسبة إلى الإنسان وكثير من الماشية: L-methionine وL-lysine والأحماض الأمينية العطرية L-phenylalanine وL-tyrosine وL-tryptophan والكارهة للماء (hydrophobic) L-leucine، L-valine وL-isoleucine. أما الأحماض الأمينية غير المولدة للبروتينات (non-proteinogenic)، ذات البنية الفراغية D على الكربون Cα **فتوجد في المركبات الطبيعية. وهي تستخدم كسينثونات منعدمة التناظر المرآتي** (chiral synthons) في التصنيع العضوي، مثلاً، في تصنيع مضادات الحيوية شبه المصنعة (semi-synthetic antibiotics).

اعتبارات اقتصادية (Economic considerations): يزيد الإنتاج السنوي للأحماض الأمينية عن 1 مليون طن/ سنة، كما تتعدى قيمتها في السوق الـ 2 بليون دولار أمريكي. إن معظم المنتجين التجاريين للأحماض الأمينية يتموضعون في آسيا، وأكثر منتجاتهم أهمية هو sodium L-glutamate (أكثر من 1000000 طن) وبعده L-lysine (400,000 طن) ثم D ،L- methionine (حوالى 200000 طن). أما الحمضيان الأمينيان L- aspartic acid وL-phenylalanine، البادئان لتصنيع مركب الـ aspartame، فيُنتج كل منهما بكمية تبلغ 10000 طن. هناك حوالى 65٪ من الأحماض الأمينية المنتجة صناعياً تستعمل في الغذاء، و30٪ في الأعلاف، وأقل من 5٪، تستعمل بشكل عالي النقاوة وخالية من السموم، في مستحضرات التجميل أو للعلاج الطبي، مثلاً، كإضافات في مواد الحقن.

الإنتاج (Production): هناك أربع طرق مختلفة يتم استخدامها في تصنيع الأحماض الأمينية: 1) الاستخلاص من نواتج تحلل البروتين (hydrolysates)، 2) التصنيع الكيميائي، 3) التحويل الحيوي (biotransformation) من مركبات كيميائية سالفة (precursors) باستخدام أنزيمات أو مفاعلات خلوية، و4) الإنتاج الميكروبي من خلال التخمير. إن استخلاص الأحماض الأمينية من البروتين المتحلل (تجمع من المركبات المنعدمة التناظر المرآتي) هي طريقة جذابة اقتصادياً، خاصة بالنسبة إلى L-cysteine وL-cystine وL-leucine وL-asparagine وL-arginine وL-tyrosine. إذ تستعمل في هذه الطريقة بروتينات نباتية مختلفة والفضلات البروتينية من المسالخ كمواد بدء. فبعد التحلل الحامضي، يتم فصل الأحماض الأمينية الكارهة للماء (hydrophobic)؛ L-phenylalanine وL-leucine وL-isoleucine أولاً من خلال الترسيب والاستخلاص بالإيثانول. ثم يجري بعد ذلك فصل الأحماض الأمينية القابلة للذوبان بالماء إلى قلوية وحمضية ومتعادلة بواسطة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني (ion exchange chromatography)، يليها عملية البلورة. أما التصنيع الكيميائي فيؤدي عادةً إلى أحماض أمينية راسمية (racemic amino acids)، بحيث يمكن أن تستعمل تجارياً إذا كان غياب التناظر المرآتي لا يؤثر في الوظيفة؛ كما هي الحالة بالنسبة إلى D ،L- alanine (من أجل الطعم النهائي لعصائر الفاكهة)، وعلى وجه الخصوص لـ D ،L-methionine كإضافة علفية. وباستخدام المحفز الحيوي الذي يكون إما أنزيماً معزولاً أو خلايا كاملة تحتوي على الأنزيم المناسب، يجري فصل الأحماض الأمينية الراسمية (racemic) إلى مصواغتين مرآتيتين (enantiomers) مختلفتين عند ذرة Cá. في الشروط التجارية، من المفضل عادة تثبيت (immobilize) المحفز الحيوي، لأن ذلك يسمح بإجراء عملية مستمرة وعمر تشغيل أطول للمحفز. إذ إن النجاح الاقتصادي لعمليات كهذه يعتمد على تصنيع بسيط غير مكلف للمركبات السالفة الكيميائية. من الممكن تقريباً تصنيع جميع الأحماض الأمينية المولدة للبروتينات (proteinognic) من خلال عمليات تخمير بطفرات منتخبة تمّت أمثلتها من خلال الهندسة الوراثية. إن طريقة التخمير تعتبر البديل الأفضل من أجل تصنيع الأحماض الأمينية. فمع توفر تسلسل جينوم بكتيريا *Corynebacterium glutamicum*، وهي منتج هام للأحماض الأمينية، فإن هذه المقاربة يمكن أن تكتسب أهمية أكثر. ولأن طرق التصنيع الحيوي لإنتاج الأحماض الأمينية مفهومة جيداً والجينات ذات العلاقة قد تم تنسيلها (كلونتها)، فإن طرقاً مثل الهندسة الأيضية يمكن أن تساهم إلى حد بعيد في أمثلة عطاء التخمير من الأحماض الأمينية.

الأحماض الأمينية الهامة صناعياً

الحمض الأميني	الإنتاج السنوي* [طن/سنة]	القيمة* [دولار أمريكي/kg]	إجراءات التصنيع	التطبيق الرئيسي
الأحماض الأمينية المولدة للبروتينات				
غلوتامات-L (L-glutamate)	>1000000	1	تخمير	معزز للطعم
لايسين-L (L-lysine)	200000	2	تخمير، مفاعل أنزيمي	إضافة علفية
ميثيونين-D,L (D,L-methionine)	200000	2	تصنيع كيميائي	إضافة علفية
ثريونين-L (L-threonine)	10000	5	تخمير	إضافة علفية
حمض الأسبارتيك-L (L-Aspartic acid)	10000	10	مزيج متعدم التناظر الرآتي، مفاعل خلوي	أسبارتام (Aspartam™)
فينيل ألانين-L (L-phenylalanine)	10000	10	تخمير، مفاعل أنزيمي	أسبارتام، في الطب
غلايسين (Glycine)	1000	10	تصنيع كيميائي	محلّي
أرجينين-L (L-arginine)	1000	20	تخمير، مزيج متعدم التناظر الرآتي	في الطب، مستحضرات التجميل
تريبتوفان-L (L-tryptophan)	1000	20	تخمر، مفاعل أنزيمي	إضافة علفية
جميع الأخرين	3000		مزيج متعدم التناظر المرآتي، تخمر، مفاعلات نزيمية وخلوية	المجال الطبي وتطبيقات أخرى
الأحماض الأمينية الأخرى (أمثلة)				
D-فينيل غلايسين,D-4-هايدروكسي بنيل غلايسين (D-phenylglcine,D-4-hydroxyphenylglycine)		تصنيع كيميائي	مركبات سالفة للأمبيسيلين (Ampecillin) والأموكسيسيلين (Amoxicillin)	
(S)-5-هايدروكسي تريبتوفان (S)-5-hydroxytryptophan		تصنيع كيميائي	أوكسيتريبتان (Oxtriptan™) مضاد إكتئاب	
*تقديرات عام 2000				





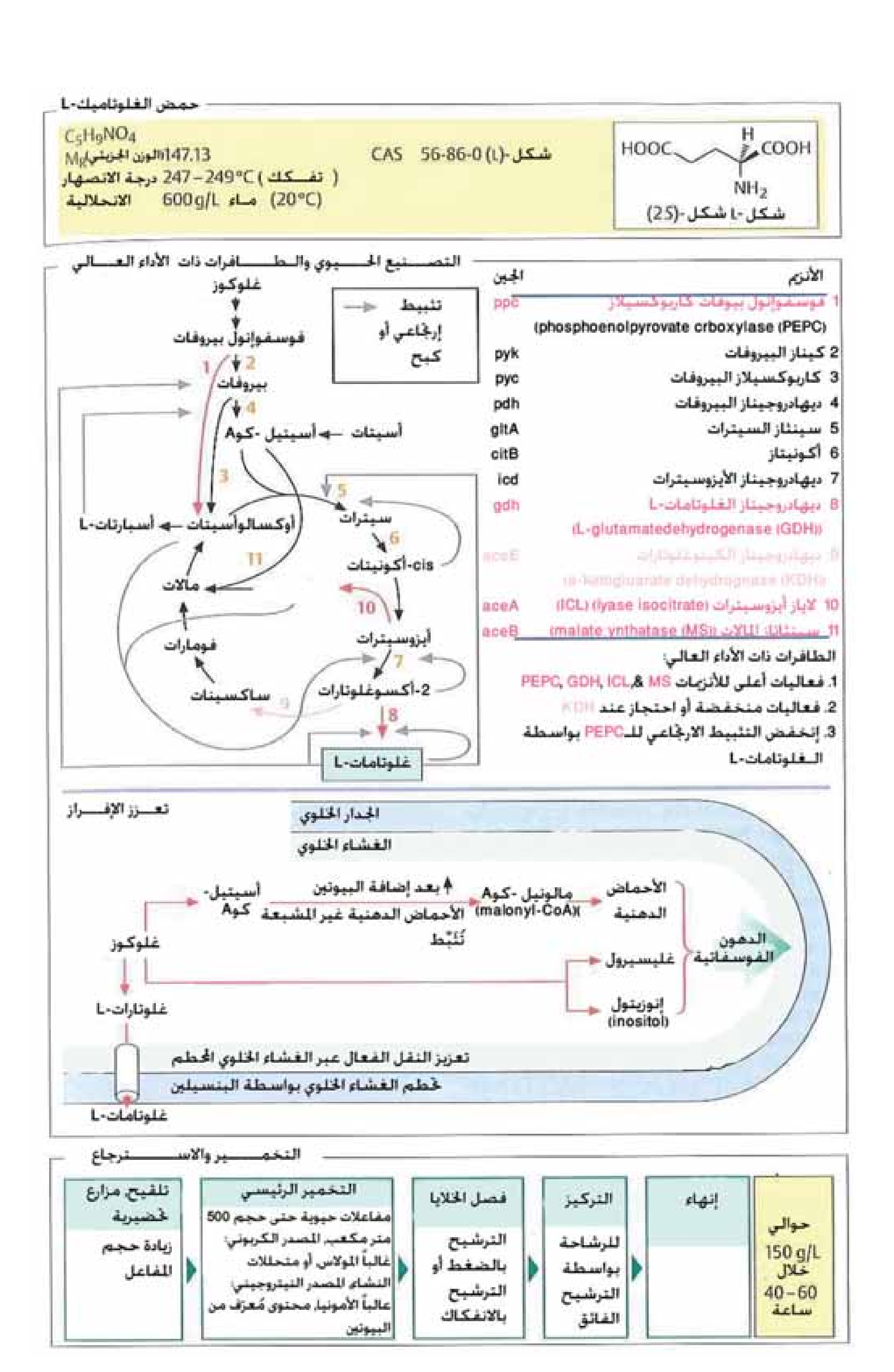
• حمض الغلوتاميك -L (L-Glutamic acid)

عموميات (General). إن حمض الغلوتاميك -L هو حمض أميني مولد للبروتينات، وأحد وظائفه الرئيسية في الكائنات الحية الأكثر تطوراً العمل كناقل عصبي (neurotransmitter) في الدماغ. تتم حماية الدماغ من تدفق حمض الغلوتاميك -L الزائد بالحاجز الدماغي الدموي (blood brain barrier (BBB))، فهو يقوم بتشكيل حمض الغلوتاميك -L من الـ غلوتامين -L الذي يمكنه عبور الحاجز الدماغي الدموي. في وقت مبكر من العام 1908، تم اكتشاف التأثير المحسن للنكهة في طحلب *konbu* في اليابان، وقد أُرجع ذلك إلى وجود حمض الغلوتاميك -L. وفي العام 1909، بدأت أجينوموتو (Ajinomoto) إنتاج هذا الحمض من نواتج التحلل الحامضي لغلوتين القمح وبروتين الصويا. بعد ذلك بفترة، في عام 1957، اكتشف الباحثون في Kyowa Hakko أن بكتيريا *Corynebacterium glutamicum* تقوم بإفراز حمض الغلوتاميك -L حينما تنمو على وسط يحتوي على السكر. وخلال العقود التي تلت ذلك، جرى تحسين هذه السلالة بالتطفير، كما تمّت أمثلة (optimization) تقانة التخمير لينتج من ذلك ارتفاع العطاء من حمض الغلوتاميك -L ليصل إلى $150gL^{-1}$.

الكائنات الحية والتصنيع الحيوي (Organisms and biosynthesis): تشكل *C.glutamicum* حمض الغلوتاميك كناتج ثانوي في دورة حمض الليمون (cetric acid cycle) من خلال الـ isocitrate والـ 2-oxoglutarate. في السلالات البرية، تكون نسبة التصنيع الحيوي للغلوتامات وأكسدة الوحدات ثنائية الكربون (units C_2) من خلال دورة حمض الليمون، منظمة بشكل صارم. لكنه، وعلى العكس من ذلك، تبدي الطفرات الصناعية خصائص مختلفة وهي: 1) إفراز الغلوتاميت بصورة أفضل، 2) إبطال تنظيم الأنزيمات الأساسية في مسار التصنيع الحيوي، و3) تفعيل المسارات التصليحية (تفاعلات المتابعة الكاملة). وتشمل التفاصيل الإضافية حول ذلك (على التتالي): 1) الحصول على طافرات ذات نفاذية غشائية زائدة من خلال تنفيذ تدابير متعددة، مثل: تخفيض توفر البيوتين، حمض الأوليك (باستعمال سلالات ذات تغذية مختلطة من حمض الأوليك -oleic acid auxotrophic) أو الغليسرول (glycerol-auxotrophic))، استعمال سلالات مشوهة الجدار الخلوية، إضافة البنسلين؛ 2) في سلالات الإنتاج تكون فعالية أنزيم نازعة الهيدروجين من ـ ديهادروجيناز ـ 2 ـ أوكسوغلوتارات (2-oxoglutarate dehydrgenase) أقل كثيراً من أنزيم نازعة الهيدروجين من ـ ديهادروجيناز ـ الغلوتامات -L، (L-glutamate dehydrogenase) (حوالى 70 مرة K_m؛ حوالى 150 مرة V_{max})؛ 3) إضافة مجموعة الكربوكسيل (carboxylation) الفوسفوإينول بيروفات (phosphoenol pyrovate (PEP)) من خلال أنزيم كربوكسيلاز الـ PEP، (PEP carboxylase) وتفعيل دورة الغلايوكسيلات (glyoxylate cycle) التي تعزز تشكيل حمض الأوكسالواستيك (oxaloacetic acid)، وهو المركب السالف لحمض الليمون، من تحلل الغلوكوز. وحيث إن أنزيم الـ PEP-carboxylase يتطلب البيوتين، فيجب أن يكون هذا العامل المساعد متوفراً بكميات كافية. أضف إلى ذلك أن عدداً من الأنزيمات المسؤولة عن التصنيع الحيوي للغلوتامات غُيِّر تنظيمها باتجاه إنتاج المستقلبات (metabolites) الوسيطية، وعدة منتجات نهائية، و NH^{4+} و $NAD^+/NADH$. إن هذه الطرق التقليدية يجري استكمالها بشكل متزايد بطرائق الهندسة الوراثية والأيضية وذلك لأن سلسلة جينوم *C.glutanicum* (3,1 مليون bp) قد تم كاملاً. وعليه، فقد جرى البحث في تأثير مجموعات الجينات المتعددة (multi-copy gene cassettes) النسخات لأنزيم الـ glutamate dehydrogenase في إنتاجية الغلوتامات.

التخمير والاسترجاع (Fermentation and recovery): يجري استخدام المولاس أو نواتج تحليل النشاء (starch hydrolysates) في أغلب الأحيان كمصدر للكربون. إذ إنه تحت ظروف الزراعة المثالية تقوم الطافرات ذات الأداء المرتفع من الـ C.glutamicum بتحويل 50 إلى 60٪ من مصادر الكربون هذه إلى غلوتامات. وتستعمل الأمونيا أو أملاح الأمونيوم كمصدر للنتروجين. كما تتم أمثلة محتوى الوسط من البيوتين، ويحافظ على درجة الرقم الهيدروجيني (pH) بين 7 و8. إضافةً إلى اعتبار توفر الأكسيجين مسألة دقيقة (تبلغ قيمة K_d المثلى $3.5\ mole\ O2\ atm^{-1}min^{-1}mL^{-1}$). تُنَفذ عملية الإنتاج في مفاعل حيوي يصل حجمه إلى $500m^3$، وتستعمل مخمرات الزرعات التحضيرية ذات الأحجام المتزايدة من أجل التلقيح. ولمنع تثبيط الهادمات (catabolite repression)، يفضل استعمال نمط الدفعة المغذاة (fed-batch) في عملية التخمير. بعد حوالى 14 ساعة (بعد تشكل كتلة خلوية) من بدء العملية، يُستبقى على مستوى الغلوكوز في الوسط عند 0,5٪ عن طريق مراقبة محتوى الغاز العادم من الـ CO_2. في النهاية، يجري عزل حمض الغلوتاميك من الوسط (حوالى $150gL^{-1}$ بعد 60 ساعة) بعد فصل الخلايا بالترشيح الفائق (ultrafiltration) ثم بكروماتوغرافيا التبادل الأيوني وكروماتوغرافيا الامتصاص.

الاعتبارات الإقتصادية (Economic considerations): يتم استخدام حمض الغلوتاميك -L بشكل أساسي في الصناعة الغذائية لتحسين النكهة، وهو غالباً ما يكوّن في صورة مندمجة مع نيوكليسيدات مثل IMP وGMP. إن الإنتاج التجاري لحمض الغلوتاميك -L يتعدى الـ 1 مليون طن، وذلك بكون الصين هي المنتج الأكبر (حوالى 700000 طن) مع تمركز معظم المنتجين الباقين في الدول الآسيوية. وعند سعر يبلغ حوالى 1000 دولار أمريكي للطن الواحد، فإن حجم السوق لحمض الغلوتاميك يتعدى الـ 1 بليون دولار أمريكي.



حمض الغلوتاميك-L
C5H9NO4
الوزن الجزيئي Mr 147.13
CAS 56-86-0 (L)-شكل
درجة الانصهار 247 – 249°C (تفكك)
الانحلالية 600 g/L ماء (20°C)
HOOC
COOH
H
NH2
شكل-L شكل-(2S)
التصنيع الحيوي والطافرات ذات الأداء العالي
غلوكوز
فوسفوإنول بيروفات
بيروفات
أسيتيل -كوA
أسيتات
أوكسالوأسيتات
أسبارتات-L
سيترات
cis-أكونيتات
مالات
فومارات
ساكسينات
أيزوسيترات
2-أكسوغلوتارات
غلوتامات-L
تثبيط
إرجاعي أو
كبح
الأنزيم
الجين
1 فوسفوإنول بيروفات كاربوكسيلاز
(phosphoenolpyrovate crboxylase (PEPC)
ppc
2 كيناز البيروفات
pyk
3 كاربوكسيلاز البيروفات
pyc
4 ديهادروجيناز البيروفات
pdh
5 سينثاز السيترات
gltA
6 أكونيتاز
citB
7 ديهادروجيناز الأيزوسيترات
icd
8 ديهادروجيناز الغلوتامات-L
(L-glutamatedehydrogenase (GDH)
gdh
9 ديهادروجيناز الكيتوغلوتارات
aceE
10 لاياز أيزوسيترات (ICL) (lyase isocitrate)
aceA
11 سينثاز المالات (malate ynthatase (MS)
aceB
الطافرات ذات الأداء العالي:
1. فعاليات أعلى للأنزيمات PEPC, GDH, ICL,& MS
2. فعاليات منخفضة أو احتجاز عند KDH
3. إنخفض التثبيط الارجاعي للـPEPC بواسطة الـغلوتامات-L
تعزز الإفراز
الجدار الخلوي
الغشاء الخلوي
أسيتيل-كوA
بعد إضافة البيوتين
الأحماض الدهنية غير المشبعة
تُثبّط
مالونيل -كوA (malonyl-CoA)
الأحماض الدهنية
غليسيرول
إنوزيتول (inositol)
الدهون الفوسفاتية
غلوكوز
غلوتارات-L
تعزيز النقل الفعال عبر الغشاء الخلوي المحطم
تحطم الغشاء الخلوي بواسطة البنسيلين
غلوتامات-L
التخمير والاسترجاع
تلقيح مزارع تحضيرية
زيادة حجم المفاعل
التخمير الرئيسي
مفاعلات حيوية حتى حجم 500 متر مكعب المصدر الكربوني: غالباً المولاس أو متحللات النشاء المصدر النيتروجيني: غالباً الأمونيا محتوى مُعرّف من البيوتين
فصل الخلايا
الترشيح بالضغط أو الترشيح بالانفكاك
التركيز
للرشاحة بواسطة الترشيح الفائق
إنهاء
حوالي 150 g/L خلال 40 – 60 ساعة

• الميثيونين -D, L، اللايسين -L والثريونين -L

(D, L-methonine, L-lysine and L-threonine)

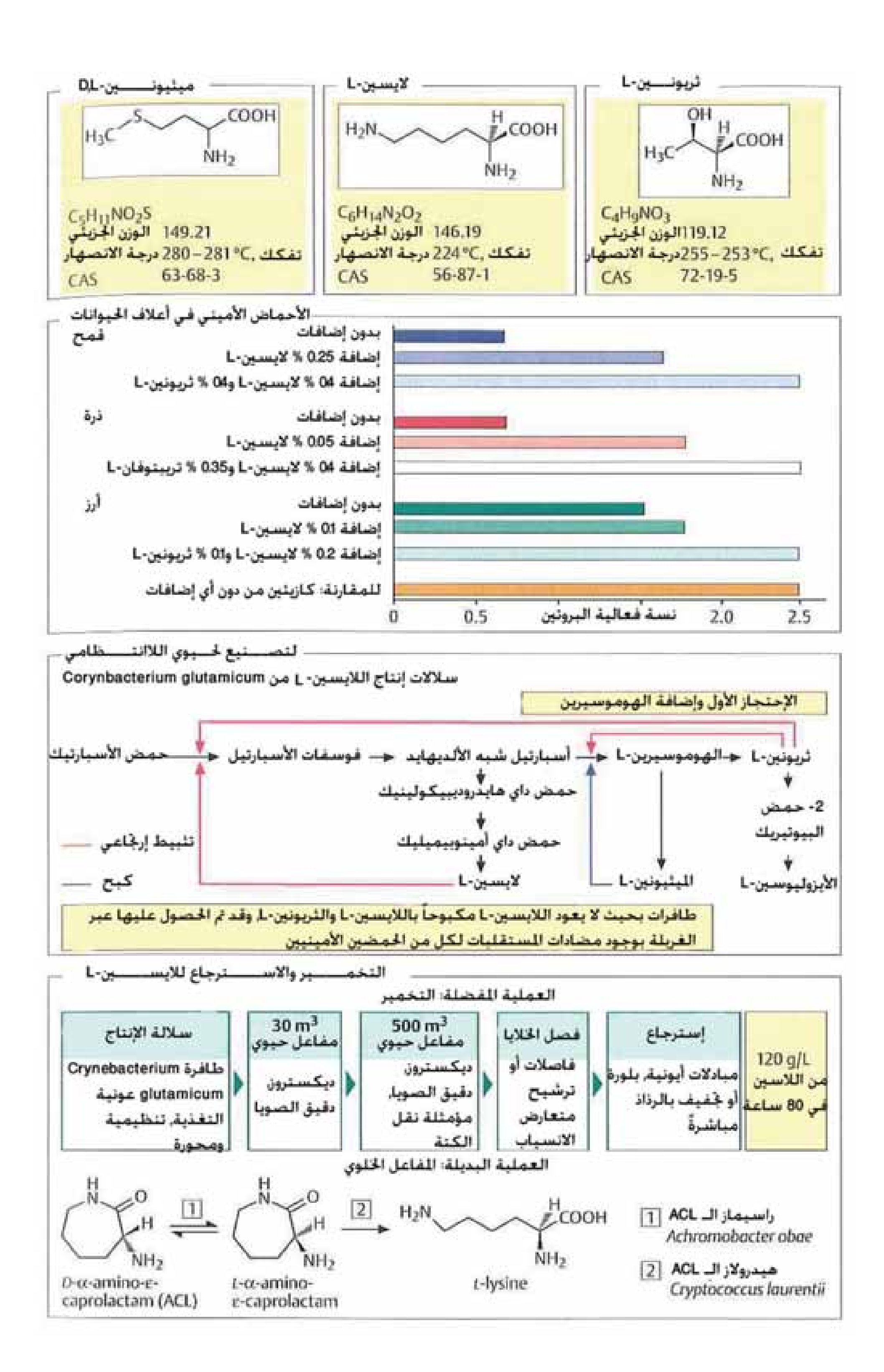
عموميات (General). تُستخدم هذه الأحماض الأمينية بشكلٍ رئيسي كإضافات غذائية، وهي بالنسبة إلى الإنسان ومعظمِ الحيوانات البيتية من الأحماض الأمينية الأساسية التي لا يتم إنتاجها في هذه الكائنات. إن كثيراً من الحبوب المستعملة كغذاء أو أعلاف، مثل، الذرة، فول الصويا، الشوفان، الشعير، القمح والأرز لا تحتوي على ما يكفي من هذه الأحماض الأمينية لتغذية صحية. لذا يوصى الأشخاص النباتيون بتناول المدعمات الغذائية من هذه الأحماض الأمينية. ويلعب هذا النقص دوراً أكثر أهمية في الأعلاف، لأن زيادة الكتلة عند تسمين الحيوان باستخدام القمح أو الأرز لا تصل إلى مقياس (standard) الكازيين (casein) الغذائي إلا عند إضافة L-lysine وL-thrionine. كما تتطلب الأعلاف المرتكزة على الذرة إضافة D، L-methionine، L-lysine وL-tryptophan. هذه الأحماض الأمينية يتم إنتاجها صناعياً من خلال التصنيع الكيميائي أو بالتخمير.

ميثونين -D, L (D, L-methonine): تشمل عملية التصنيع خمس خطوات تتضمن الأكرولين (acrolein) والميثان ثايول (methanethiol) والـ HCN، ما يؤدي إلى تشكل المركب الوسيط الهيدانتيون (hydantion). ولأن الـ D-methionine يجري تحويله إلى L-methionine في الحيوانات الأكثر تطوراً، فإن الأحماض الأمينية الراسيمية D (racemic)، L-methionine يمكن استخدامها كإضافات علفية؛ وليس من الضروري فصل مصاوغاتها المرآتية (enantiomers). وهناك كميات قليلة من الـ L-methionine التي يتم تصنيعها من تحلل مشتقات الـ D، L-methionine بواسطة الأنزيمات التي تقطع مشتقات الـ L-enantiomer انتقائياً.

لايسين -L (L-lysine): وهو يُنتج بشكلٍ أساسي بالتخمر باستعمال طافرات (mutants) من بكتيريا *Corynebacterum glutamicum*. يتشكل اللايسين بواسطة الأوكسالوأسيتات (oxalocetate) في دورة حمض الليمون (cetric acid cycle) عبر تكثف حمض الأسبارتيك (aspartic acid) وحمض البايروفيك (pyruvic acid) في مسار متعدد الخطوات يتضمن الـ diaminopimelic acid (DAP) كمركب وسيط (intermediate). كما تؤدي تفرعات هذا المسار إلى L-threonine وL-methionine، التي يمكن أن تعيق تشكيل اللايسين (lysine) بالتثبيط الرجعي (feedback inhibition). في السلالات الطافرة المنتجة للايسين بشكلٍ مفرط، تُحذف هذه العملية التنظيمية نتيجة إلغاء الضوابطُ التنظيمية أو تجاوز الأنزيمات المنظَّمة جداً من خلال عقبة التغذية المخلطة (auxotrophic block) لدى الطافرات (المرتكزة في الغالب على المدد الخارجي من الـ homoserine). وحيث إن كامل جينوم *C.glutamicum* قد تم الحصول عليه وتوضيحه، فقد نُسِّلت جميع الجينات المشفرة للأنزيمات المنخرطة في هذا المسار، حيث إن طرائق الهندسة الوراثية والأيضية (metabolic) التي تعتمد على تحليل التدفق (flux analysis) تلعب الدور الأكثر أهمية في الحصول على سلالات طافرة أكثر كفاءة. حالياً، تبلغ عطاءات الإنتاج حوالى $120gL^{-1}$ في الـ 60 ساعة، و(كما هو الحال في الـ L-glutamate) تُستَخدم بروتوكولات الدفعة المغذاة (fed-batch) في مفاعلات ذات حجم يصل إلى $500m^3$. وفي عملية الإنتاج هذه يكون مولاس قصب السكر هو المصدر الكربوني عادة، كما يجب أن يكون محتوى البيوتين (biotin) في الوسط أعلى من $30\mu gL^{-1}$. أما الاسترجاع فيشتمل على فصل الخلايا بالفارز (separator) وكروماتوغرافيا التبادل الأيوني (ion exchange chromatography) والتجفيف بالرذاذ (spray drying). وهناك بديل هام بالرغم من عدم جدواه من الناحية الاقتصادية، وهو إنتاج اللايسين من، D، L-α-amino-ε-caprolactam (ACL) وهو مركب وسيط قليل التكلفة مأخوذ من التصنيع الكيميائي للنايلون (NylonTM)، بوجود خلايا مجففة بالأسيتون من بكتيريا Cryptococcus laurentii في مفاعل خلوي. فبعد تحلل انتقائي المصاوغة المرآتية (enantioselective hydrolysis)، تؤدي عملية إعادة راسيمية الوسيط D-α-amino-ε-caprolactam بواسطةالأنزيم D-aminocaprolactam racemase وباستعمال خلايا Achromobacter obae إلى عطاء كمي من اللايسين تقريباً.

ثريونين -L (L-threonine): إن الكائنات الحية المختارة لإنتاج هذا الحمض الأميني هي طافرات لا نظامية من Escherichia coli. تقوم أفضل السلالات بتشكيل $80gL^{-1}$ فقط من تاثريونين في الـ 30 ساعة. لذلك تم تنسيل مشغل ـ أوبرون ـ الثريونين الحيوي (operon) في هذه البكتيريا وهو يُستخدم لتحسين سلالاتها بشكل إضافي. تبدأ عملية الاسترجاع بفصل الخلايا، يليها الترشيح الفائق (ultrafiltration) ثم بلورة (crystallization) الناتج من هذا الترشيح.

اعتبارات اقتصادية (Economic considerations): يبلغ الإنتاج السنوي من L-lysine 400000 طن، ومن D، L-methionine 200000 طن ومن L-threonine 10000 طن. والعملية المفضلة لإنتاج الميثونين هي التصنيع الكيميائي للمزيج الراسمي (racemate). أما إنتاج L-threonine وL-lysine فيتم حصرياً بالتخمير. تتراوح أسعار الميثونين واللايسين ما بين 2000 و40000 دولار أمريكي للطن، وبذلك تكون ذات قيمة في السوق قريبة من 1 بليون دولار أمريكي. من المتوقع في المستقبل البعيد أن تلقى إضافة الأحماض الأمينية المنتجة صناعياً إلى الأغذية والأعلاف منافسة من قبل المحاصيل المحورة (transgenic crops) التي تحتوي تركيباً غذائياً مؤمثلاً من الأحماض الأمينية.



D,L-ميثيونين
$C_5H_{11}NO_2S$
الوزن الجزيئي 149.21
تفكك, 280 – 281 °C درجة الانصهار
CAS 63-68-3
L-لايسين
$C_6H_{14}N_2O_2$
الوزن الجزيئي 146.19
تفكك, 224 °C درجة الانصهار
CAS 56-87-1
L-ثريونين
$C_4H_9NO_3$
الوزن الجزيئي 119.12
تفكك, 255 – 253 °C درجة الانصهار
CAS 72-19-5
الأحماض الأمينية في أعلاف الحيوانات
قمح
بدون إضافات
إضافة 0.25 % لايسين-L
إضافة 04 % لايسين-L و04 % ثريونين-L
ذرة
بدون إضافات
إضافة 0.05 % لايسين-L
إضافة 04 % لايسين-L و0.35 % تريبتوفان-L
أرز
بدون إضافات
إضافة 0.1 % لايسين-L
إضافة 0.2 % لايسين-L و0.1 % ثريونين-L
للمقارنة: كازيئين من دون أي إضافات
0
0.5
نسبة فعالية البروتين
2.0
2.5
لتصنيع الحيوي اللانتظامي
سلالات إنتاج اللايسين-L من Corynbacterium glutamicum
الإحتجاز الأول وإضافة الهوموسيرين
حمض الأسبارتيك
فوسفات الأسبارتيل
أسبارتيل شبه الألديهايد
L-الهوموسيرين
L-ثريونين
حمض داي هايدروديبيكولينيك
حمض داي أمينوبيميليك
L-لايسين
L-الميثيونين
2- حمض البيوتيريك
L-الأيزوليوسين
تثبيط إرجاعي
كبح
طافرات بحيث لا يعود اللايسين-L مكبوحاً باللايسين-L والثريونين-L، وقد تم الحصول عليها عبر الغربلة بوجود مضادات المستقلبات لكل من الحمضين الأمينيين
التخمير والاسترجاع للايسين-L
العملية المفضلة: التخمير
سلالة الإنتاج
طافرة Crynebacterium glutamicum عونية التغذية، تنظيمية ومحورة
30 m^3 مفاعل حيوي
ديكستروز
دقيق الصويا
500 m^3 مفاعل حيوي
ديكستروز
دقيق الصويا
مؤمثلة نقل الكتلة
فصل الخلايا
فاصلات أو ترشيح متعارض الانسياب
إسترجاع
مبادلات أيونية، بلورة أو تجفيف بالرذاذ مباشرة
120 g/L من اللايسين في 80 ساعة
العملية البديلة: المفاعل الخلوي
D-α-amino-ε-caprolactam (ACL)
L-α-amino-ε-caprolactam
L-lysine
1 راسيماز الـ ACL
Achromobacter obae
2 هيدرولاز الـ ACL
Cryptococcus laurentii

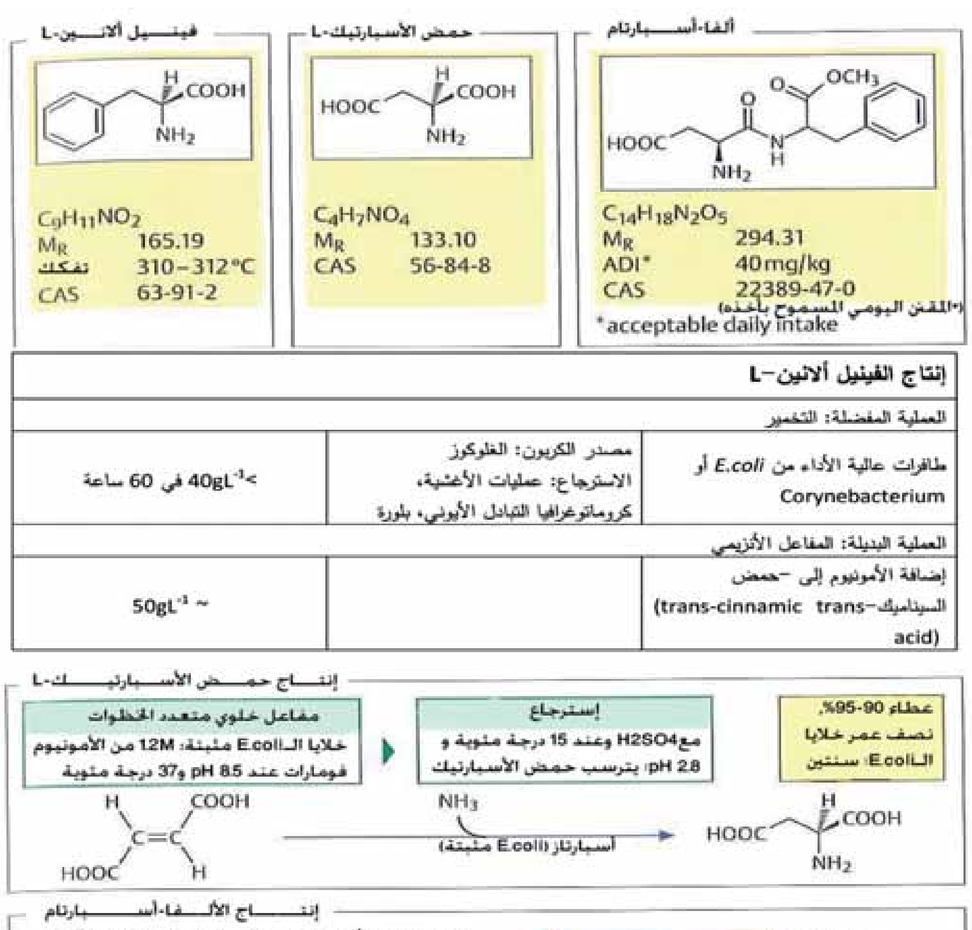
• الأسبارتام™، الفينيل آلانين -L وحمض الأسبارتيك -L (Aspartame™, L-phenylalanine and L-aspartic)

عموميات (General). الأسبارتام -L-α-aspartyl-L) phenylalanine-methylester) هو مُحلي مصنع منخفض السعرات الحرارية يحلي أكثر من السكروز بما يقارب الـ 200 ضعف. وهو مسجل كمضاف غذائي حيث يتم انتاجه بمستوى الـ 10000 طن سنوياً. تتألف مواد البدء لتصنيعه من L-aspartic acid وL-phenylalanine. يتطلب التصنيع الكيميائي للأسبارتام عدة مجموعات وقاية وبالتالي فإن تصنيعه كيميائياً ليس منافساً للتصنيع الأنزيمي.

حمض الأسبارتيك -L (L-aspartic acid): يمكن أن يتم عزله بالاستخلاص من نواتج تحلل البروتين. إلا أن التصنيع المفضل لحمض الأسبارتيك هو بإضافة الأمونيا إلى حمض الفيوماريك بواسطة خلايا Escherichia coli. يستعمل لذلك عادة مفاعل خلوي تكون البكتيريا فيه مثبتة على الكابا كاراجينان (κ-carrageenan) أو البولي أكريلامايد (polyacrylamide). تبلغ إنتاجية هذا النظام حوالى $140gL^{-1}$ في الساعة والثبات التشغيلي (operational stability) (نصف عمر المحفز) حتى السنتين. وباستعمال خلايا مجففة (lyophilized) تم تحريضها، ارتفعت العطاءات حتى $166gL^{-1}$. كما يمكن لتشكيل أنزيم الأسبرتاز (aspartase) في خلايا E.coli K12 أن يضاعف 30 مرة، وذلك عندما يعبر عن البلازميد الذي يحتوي الجين المشفر للأسبارتاز (*asp*A). ومقارنةً بالمفاعل الخلوي، لا تعتبر عمليات التخمير منافسة حتى ولو استعملت طافرات عالية الأداء.

الفينيل آلانين -L، (L-Phenylalanine): في الماضي، كان الإنتاج الصناعي للفينيل ألانين قائماً على أساس المفاعلات الأنزيمية باستخدام وحدات بناء كيميائية متوفرة. ومؤخراً، أصبحت عمليات التخمير القائمة على استخدام طافرات (mutants) عالية الأداء، منافسة لعملية التصنيع الأنزيمي. إذ إن توفر وسعر مركبات التصنيع السالفة (synthetic precursors) مقارنة بالعطاءات الزمكانية (space-time yields) في عملية التخمير هي من العوامل المحدِّدة للأولوية الإقتصادية. أما حالياً، فقد تم الحصول على أفضل النتائج بإضافة الأمونيا إلى trans-cinnamic acid باستخدام أنزيم فينيل ألانين أمونيا لاياز (phenylalanine ammonia lyase) المأخوذ من Rhodotorula glutinis. في المفاعل الخلوي، تبلغ عطاءات الإنتاج باستخدام الكائن المجهري على هيئة مثبتة (immobilized) حوالى $50gL^{-1}$ مع معدل تحويل (turn over) يبلغ 83٪. كما أنه من الممكن قطع المركب D، -L-5 benzylhydantion بواسطة الأنزيمات L-hydantionase و-L-N carbamoylase المأخوذين من بكتيريا *Flavobacterium ammoniagenes*. أما في عمليات التخمير، حيث يُستعمل في أغلب الأحيان طافرات عالية الأداء من *E.coli* وCorynebacterium، فإن التصنيع الحيوي لـ -L phenylalanine ينشأ من المركبات السالفة -erythrose-4 phosphate وphosphoenolpyruvate بواسطة مركبات وسيطة مثل حمض الشيكيميك (shikimic acid) وحمض الكوريزميك (chorismic acid) وحمض البريفينيك (prephenic acid). يشمل مسار التصنيع الحيوي هذا تفرعات تقود إلى إنتاج -L tyrosine وL-tryptophan، حيث إن كثيراً من أنزيمات هذا المسار هي عالية التنظيم. وبالنتيجة، فإن الطافرات المخلطة التغذية (auxotrophic mutants) هي التي تُستَخدم بشكلٍ رئيسي لإنتاج الحمض الأميني L-phenylalanine. فقد نسِّلت(تمّت كلونة) معظم جينات هذا المسار، كما يمكن استخدام طرائق وراثية لتطوير سلالات غير مثبِّطة (derepressed strains) للإنتاج. فعلى سبيل المثال، يصل عطاء الإنتاج إلى $45gL^{-1}$ باستخدام سلالات مأشوبة من *Brevibacterium fermentum*. إن عملية التخمير يجري تنفيذها باستخدام نمط الدفعة المغذاة (fed-batch)، حيث يتم فصل الخلايا بالترشيح ويسترجع المنتج بتركيز المرق عن طريق الترشيح الفائق (ultrafiltration) الذي يليه كروماتوغرافيا الإدمصاص (adsorption chromatography) والبلورة.

الأسبارتام Aspartam™: يتطلب التصنيع الكيميائي للأسبارتام من الحمضين الأمينيين المكونين له استعمال مجموعات واقية ومن ثم إزالتها. ومقارنةً بالعملية المتعددة الخطوات هذه، تعتبر عملية الإنتاج الأنزيمي أكثر بساطة: فقط تحتاج المجموعة الأمينية للحمض L-aspartic للوقاية ثم يضاف الأنزيم ليحفز (catalyse) إضافة مجموعة الأميد من مجموعة α-carboxy في الحمض الأميني L-Z-aspartic acid (المصاوغ L-β-aspartyl-L-phenylalanyl-methylester مر المذاق) إلى المركب L-phenylalanine methylester. تسمح انتقائية الموقع (regioselectivity) لهذا الأنزيم باستعمال phenylalanine methylester الراسمي في هذا التفاعل، حيث إن الأنزيم المفضل في هنا هو الثيرمولايزين (thermolysin) المثبت المأخوذ من Bacillus stearothermophilus، كما أن المذيب المفضل هو i-amyl alcohol. إن أنزيم الـ thermolysin هو ثابت تماماً حرارياً ويسمح بدرجة حرارة تفاعل 70°C، مما يؤدي إلى عطاء زمكاني قدره $30gL^{-1}$ في الساعة. كما أن منتج التفاعل هو عالي النقاوة، وتتم تنقيته أكثر باستعمال كروماتوغرافيا التبادل الأيوني. إن الأسبارتام هو فقط واحد من سلسلة المحليات الطبيعية المنخفضة السعرات الحرارية التي أدخلت إلى السوق حديثاً، فمن الأمثلة الأخرى للمحليات المصنعة الـ stevioside (ثنائي التيربين المضاف إليه مجموعة الغلايكوزيل)، الـ thaumatin أو الـ monellin (البروتينات والببتيدات على التتالي المضاف إليها مجموعات الغلايكوزيل).



إنتاج الفينيل الانين–L		
العملية المفضلة: التخمير		
طافرات عالية الأداء من *E.coli* أو Corynebacterium	مصدر الكربون: الغلوكوز الاسترجاع: عمليات الأغشية، كروماتوغرافيا التبادل الأيوني، بلورة	$>40gL^{-1}$ في 60 ساعة
العملية البديلة: المفاعل الأنزيمي		
إضافة الأمونيوم إلى –حمض السيناميك–trans (trans-cinnamic acid)		$\sim 50gL^{-1}$

إنتاج الألفا-أسبارتام

- L-Z-حمض السبارتيك + DL-فينيل الانين-OMe
- ثيرمولايسين مثبت، 60°C، 2 ساعة
- L-Z-ألفا-أسبارتيل-L-فينيل الانين-OMe
- هدرجة كيميائية → ZH
- L-ألفا-أسبارتيل-L-فينيل الانين-OMe
- ألفا-أسبارتام
- D-فينيل الانين-OMe ← جعل المركب راسيمي

تحفيز أنزيمي →
خطوات كيميائية →
Z=بينزيل أوكسي كاربونيل (benzyloxycrbonyl)

المُحلّي		البناء الكيميائي	التحلية النسبية
ساكاروز	(saccharose)	ثنائي السكاريد	1
سيكلامات	(cyclamate)	سايكلوهيكسيل سالفامايد مصنع، ملح الصوديوم	40
ألفا – أسبارتام		ميثيل إستر ثنائي الببتيد	200
ستيفيوزايد	(stevioside)	ثنائي التربين المضاف إليه غلايكوزيل	300
ساكارين	(saccharin)	2– حمض السلفوبينزويك إمايد المصنع، ملح الصوديوم	450
ثوماتين	(thaumatin)	بروتين غير مضاف إليه غلايكوزيل مكون من 208 أحماض أمينية	2500
مونيلين	(monellin)	بروتين غير مضاف إليه غلايكوزيل، مكون من سلسلتين ببتيدتين مؤلفتين من 44 و 50 حمض أميني	2500

• أحماض أمينية منتجة بواسطة التحويلات الأنزيمية
(Amino acids via enzymatic transformation)

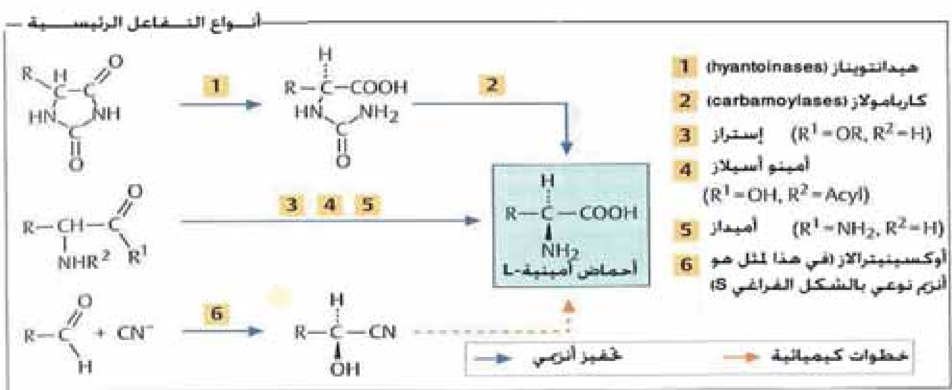
عموميات (General) : كما تبيَّن سابقاً ومن خلال عدة أمثلة (L-lysine وL-aspartic acid وL-phenylalanine)، فإن الأحماض الأمينية منعدمة التناظر المرآتي يمكن أن تحضر بعمليات التحويل الأنزيمية للوحدات البنائية الراسمية (racemic building blocks). تكمن ميزة العمليات الأنزيمية عن إجراءات التخمير في إمكانية تحضير أحماض أمينية غير مولدة للبروتينات وحتى غير طبيعية. تستعمل معظم التحولات الأنزيمية من هذا النوع أنزيمات الهيدرولاز ومركبات أصل راسيمية. والأمثلة على هذه الأنزيمات تضم الإستراز، والأمينوأسيلاز، الأميداز والهايدانتيوناز/كاربامويلاز. إلا أن القيد الذي يكمن في هذه العملية هو الحاجة إلى إعادة راسيمية المصاوغ المرآوي «الخاطىء» في تفاعل مترافق للتحويل الأنزيمي، بغية إعادته ثانية إلى التفاعل. ونتيجة لذلك تتم دراسة تفاعلات الإضافة التي تعتمد على أنزيمات اللاياز وتفاعلات الخزلدة التي تعمد على أنزيمات الأكسدة والاختزال بشكلٍ كثيف، وذلك لأنها تؤدي إلى مصاوغ مرآوي واحد فقط.

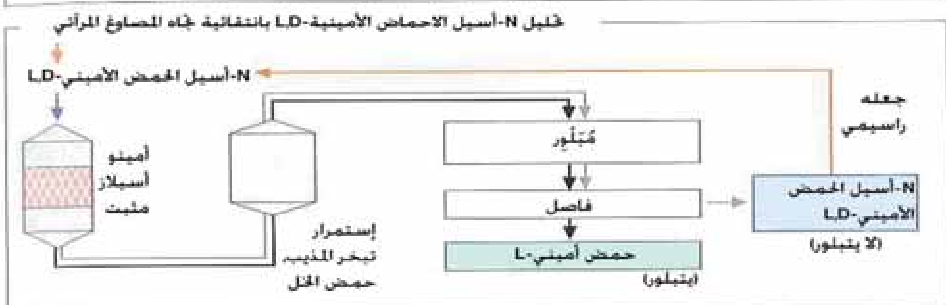
التحليل المائي الانتقائي المصاوغة المرآوية (Enantioselective hydrolysis) : تعتبر المفاعلات الأنزيمية المرتكزة على أنزيمات الأمينوأميلاز والهايدانتيوناز الأكثر تطوراً حتى هذا التاريخ، حيث جرى إنتاجها على مستوى صناعي في بعض الحالات. في تفاعلات الـ aminoacylase، تقوم أنزيمات الارتباط بالحامل (مثلاً، المأخوذ من *Aspergillus oryzae* أو من *Bacillus thermoglucosidius*) بتحليل الأحماض الأمينية في المزيج الراسيمي، فتحلّل فقط المصاوغ المرآوي ذا الوضعية -L (L-enomtiomer) بينما يبقى الـ N-acyl-D-amino acid في مزيج التفاعل ليتم عزل الأحماض الأمينية ذات الوضعية -L عنه بالتبلور فيما بعد. وبعد إعادة راسيمية المصاوغ المآوي «الخاطئ»، التي غالباً ما تكون من خلال التفاعل الحراري، فإنه يُدمَج مع مركب سالف راسمي جديد، ثم يعاد إلى المفاعل ثانية. من خلال هكذا تقانة، يتم إنتاج مئات الأطنان من الأحماض الأمينية -L methionine وL-tyrosine وL-proline وL-valine سنوياً من أجل الاستعمال الطبي (لمستحضرات الحقن بشكلٍ رئيسي). وبالرغم من أنه يمكن إنتاج الأحماض الأمينية ذاتِ الوضعية -D (D-amino acids) بهذا الأسلوب، فإن أنزيمات الـ hydantionases، التي يمكن أن تعزل من تنوعات عديدة من الكائنات المجهرية، تقدم الخيار الأفضل لتحضير الأحماض الأمينية غير المولدة للبروتينات وغير الطبيعية. في هذه العملية تُشطَر الهايدونتيونات الراسمية بواسطة أنزيمات الـ hydantionases ذوات التخصص المرغوب، وتتشكل الأحماض الأمينية المضاف إليها مجموعة الكاربامويل على ذرة النيتروجين كمنتج أولي التي يمكن ان تُحلَّل إلى الحمض الأميني المنعدم التناظر المرآتي المرغوب. وبعدها تُعاد رسيمية الـ hydantion «الخاطىء» عند رقم هيدروجيني (pH) 8,5 لينخرط في دورة تحلل جديدة. تستعمل هذه الطريقة لتصنيع R-phenylglycine وR-4 hydroxyphenylglycine التي هي السلاسل الجانبية للمضادات الحيوية الأمبيسيلين والأموكسيسيلين (البنسيلينات شبه المصنعة).

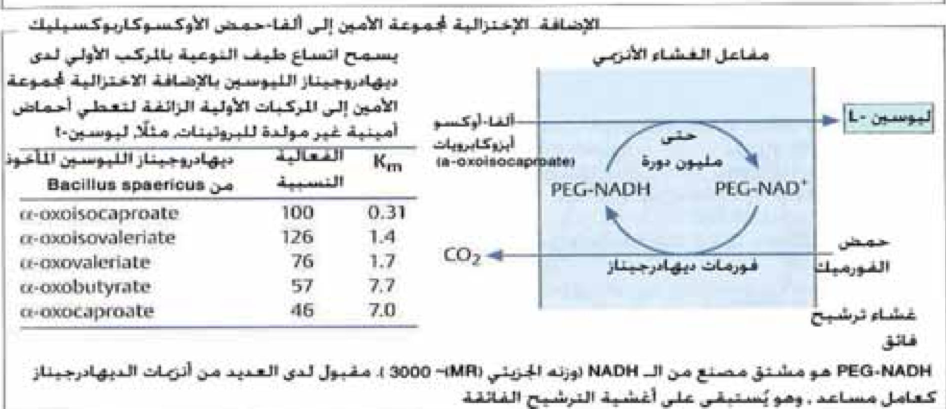
تفاعلات الإضافة الانتقائية المصاوغة المرآتية (Enantioselective addition reactions) : توجد أنزيمات الأوكسينيتراز بشكلٍ أساسي في النباتات، وهي تبدي انتقائية للمصاوغ R أو S، وبذلك فهي لا تؤدي إلى تشكيل ناتج ثانوي غير مرغوب التناظر المرآتي (chirality). لقد أمكن تنسيل (كلونة) والتعبير عن كِلا نوعي الـ oxynitrilases في بكتيريا الـ *Escherichia coli* أو الخمائر، وهي بالتالي متوفرة للاستثمار. تضم الأمثلة على هذه الأنزيمات S-oxynitrilase من الـ Manihot، وS-oxynitrilase من اللوز. وقد تم تحديد البنية البللورية لكلا الأنزيمين؛ حيث يستعمل الباحثون الآن هندسة البروتينات لزيادة تخصصهما بالمركب الأولي واستعمالهما بالنهاية في التطبيقات الصناعية المختلفة.

تفاعلات الخزلدة الانتقائية المصاوغة المرآتية (Enentioselective redox reactions) : إن مثال التصنيع الانتقائي الفراغية للحمض الأميني L-leucine من α-oxo caprioc acid، يبين أن تفاعل إضافة مجموعة الأمين الاختزالي للمركبات المحتوية على مجموعة الأوكسو (α-oxo; O=) بواسطة أنزيم نازعة الهيدروجين من ـ ديهادروجيناز ـ الليوسين -L (L-leucine dehydrogenase)، المأخوذ من أنواع (فصائل) بكتيريا Bacillus، لا يتطلب NH_3 فقط، ولكن NADH أيضاً. وحيث إن الـ NADH مكلف، فإن تجديده يعتبر ضرورة حتمية لتحقيق عملية اقتصادية. إلا أن هناك أسلوباً ممتازاً يعتمد على استعمال أنزيم نازعة الهيدروجين من ـ ديهادروجيناز ـ الفورمات المأخوذ من الفطر *Candida biodinii*؛ في هذا التفاعل يتبخر ناتج التفاعل الـ CO_2 من المزيج، وبالتالي يدفع بالتوازن نحو تشكيل الـ L-leucine، وإذا تم ربط البولي إثيلين غلايكول (PEG) بالـ NADH، يبقى العامل المساعد فعالاً بحيث يُستبقى في مفاعل الأغشية الأنزيمية. من خلال هذه التقانة أمكن الحصول على ما يكافىء 6.10^5 moles من المنتج من كل مول من NADH-PEG مستهلك. وكبديل من ذلك، يمكن تجديد الـ NADH أيضاً بالتقافها بواسطة القابلات مثل أزرق الميثيلين أو بأساليب كهروكيميائية من خلال تخفيض العطاء. وقد تم تنسيل (كلونة) معظم الأنزيمات المستعملة في هذا التفاعل، كما تم تعديلها بواسطة هندسة البروتين لزيادة ثباتيتها وتخصصها (مثلاً، لتجديد الـ NADPH عوضاً عن الـ NADH).

أنواع التفاعل الرئيسية		
نوع التفاعل	**نوع الأنزيم**	**تعليقات**
تحلل المركبات السالفة الراسيمية (racemic precursors)	هيدرولاز	مفضل، تفاعل بسيط، لكنه باهظ الثمن، لأن المصاوغ المرآتي (enantiomer) " الخطأ" يجب جعله راسيمياً
إضافة الـ HCN أو الأمونيا إلى مركبات الكاربونيل	لاياز	تفاعل بسيط، كمي، لكن احتمالات اختيار الأنزيمات محدودة
إضافة مجموعة الأمين المُختَزلة إلى ألفا – حمض الأوكسوكاربوكسيليك	ديهادروجيناز	يتشكل مصاوغ مرآتي واحد فقط، لكن الأنزيمات المساعدة والعوامل المساعدة المستخدمة تجعل العملية مكلفة







مضادات الحيوية

مضادات الحيوية: وجودها، تطبيقاتها، آلية عملها
(Antibiotics: Occurrence, applications, mechanism of action)

عموميات (General). في العام 1928، لاحظ عالم الأحياء المجهرية البريطاني ألكسندر فلمنغ (Alexander Fleming) أن إصابة فطرية على أطباق الآغار أوقفت نمو البكتيريا العنقودية (Staphylococci). بعد عقد من الزمن، نجح هوارد فلوري (Howard Flory)، وهو أسترالي يعمل في المملكة المتحدة، في عزل وتنقية وتحديد بنية مزيج مضادات الحيوية الفطرية المسؤولة عن ملاحظة Fleming. وقد قادت النجاحات التي أُحرزت في التجارب على الحيوانات وفي معالجة مرضى مصابين بالعنقوديات إلى بدء مشروع على مستوى ضخم بواسطة حلف بريطانيا/ الولايات المتحدة في الحرب العالمية الثانية. ومع العام 1945، أمكن تحضير البنيسلين (penicillin) بالكيلوغرامات. ثم في العام 1947، اكتشف سيلمان واكسمان (Selmann Wasksman)، وهو عالم أحياء مجهرية روسي ـ أمريكي، في مزارع Streptomyces griseus الستربتومايسين (Streptomycin)، وهو مضاد حيوي جديد، غير البنيسلين، فعال أيضاً ضد الكائنات المجهرية سلبية الغرام (gram negative microorganisms). وفي السنوات اللاحقة، أدت الغربلة المنهجية (systematic screening) إلى اكتشاف عدد كبير من مضادات الحيوية الجديدة، كما أُطلقت عمليات تصنيعها على المستوى الصناعي. إلا أن الاستعمال غير الدقيق للمضادات الحيوية ضد أمراض بسيطة وإضافتها إلى مكونات الأعلاف في تسمين الحيوانات ما لبث أن أدى إلى تطور المقاومة لمضادات الحيوية في الكائنات المجهرية، التي تعتبر الآن موضع قلق رئيسي في المستشفيات (إصابات المشافي nosocmial infections). وفي محاولة للتصدي لهذه الظاهرة، طُوِّرَت أشكال جديدة من مضادات الحيوية حيث إن استعمالها مقيد بتطبيقات متخصصة. كما تم تكميل طرق الغربلة حديثاً بالطرائق الوراثية مثل الاندماج الخلوي لكائنات مختلفة منتجة لمضادات الحيوية وخلط العناقيد الجينية (gene clusters shuffling) المسؤولة عن التصنيع الحيوي للمضادات الحيوية.

وجودها (Occurance): من المعروف الآن أكثر من 25000 منتَج ميكروبي، وحوالى 50٪ منها يبدي فعالية مضادة حيوية تحت الظروف المناسبة. كما جرى عزل حوالى 4000 مضاد حيوي من كائنات أكثر تطوراً كالحزاز (lichens) والنباتات والحيوانات، لكن الأكتينومايسيت (Actenomycetes) تفوق جميع الكائنات الأخرى في قدرتها على تصنيع مضادات الحيوية.

تطبيقاتها (Applications): ينتج صناعياً فقط حوالى 200 مضاد حيوي، ومعظمها مركبات شبه مصنعة حيث تُعدَّل بنيتها الفعالة بيولوجياً بالمعالجات الكيميائية. تشكل مضادات الحيوية من β-Lactam (التي تضم البنيسلينات (pencillins) والسيفلوسبورينات (cephalosporins)) تقريباً نصف السوق العالمي من مضادات الحيوية المقدرة بـ 24 بليون دولار أمريكي. إن معظم مضادات الحيوية يتم تصنيعها كعوامل مضادة للميكروبات بغرض المعالجة الكيميائية، إذ يمكن تصنيفها إلى مضادات حيوية واسعة الطيف، تؤثر في مدى واسع من الممرضات (pathogens) (مثال، cephalosporins وtetracyclines)، ومضادات حيوية انتقائية تستعمل لمعالجات عالية التخصص (highly specific) (مثال، الـ rifampicin ضد السل وamphotericin B ضد الإصابات الفطرية). أما مضادات الحيوية المضادة للأورام فهي مواد هامة تحد النمو الخلوي (cytostatics)، إلاّ أنها تبدي أيضاً سمّيّة عالية؛ ومثالها هوالـ adriamycin.

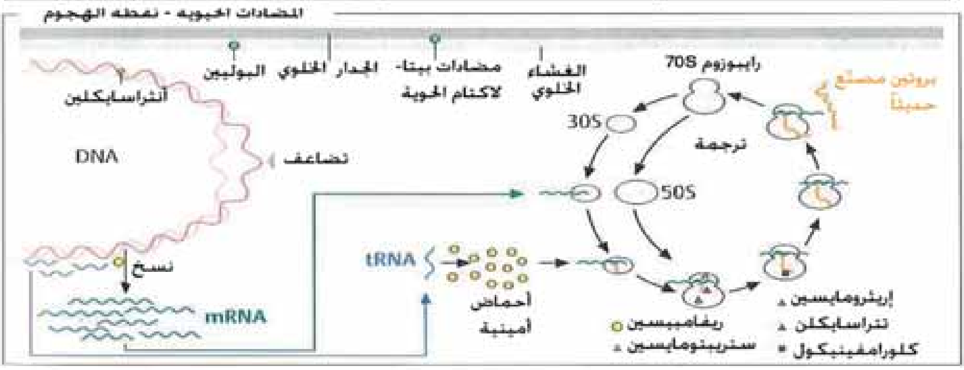
لقد استُعملت عدة مضادات حيوية في وقاية النبات، التي تكون فعالة غالباً عند تراكيز اقل من مبيدات الأعشاب، كما تبدي سمّيّة خفيفة ضد الثديات؛ وأمثلتها الـ blasticidins وkasugamycin. أما في حفظ الغذاء، فيستعمل عدد قليل من مضادات الحيوية؛ مثل الـ pimarcin الذي يستعمل أحياناً كمضاد للفطريات في الأجبان. كما أدى استخدام مضادات الحيوية في الأعلاف إلى تحقيق إرضاع أفضل ونمو أسرع في الإنتاج الحيواني، لكن هذه المضادات تكون عادةً محددة للاستعمال العلفي فقط (مثال monensin في إنتاج الفروج) وذلك لمنع المقاومة الخلطية في العلاج الطبي (clinical cross). وفي مجال علم الأحياء الجزيئية، تنفع مضادات الحيوية كأداة في البحوث المتعلقة بالتثبيط الانتقائي لمختلف وظائف الخلية.

آلية عملها (Mechanism): يمكن لمضادات الحيوية أن تؤثر في: 1) التصنيع الحيوي للمكونات الخلوية وآلياتها الوراثية، 2) التصنيع الحيوي لمكونات الخلية، 3) التصنيع الحيوي للبروتينات ووظائفها، 4) التصنيع الحيوي للغشاء السيتوبلازمي أو، كما في البكتيريا سلبية الغرام، للغشاء الخلوي الخارجي ووظيفته، و5) التصنيع الحيوي للجدار الخلوي. هذا وإن التفاعلات المتبادلة فيما بينها متنوعة. وكنتيجة لقصر زمن تولدها وتأقلمها السريع للبيئات المتغيرة، تصبح الكائنات المجهرية مقاومة للمضادات الحيوية بسرعة، ماينتج منه سباق مستمر بين تطوير مضادات حيوية جديدة وتواجد سلالات مقاومة جديدة.

الإيجاد	
المجموعة التصنيفية	**العدد النسبي (%)**
البكتيريا الخيطية (actenomycetes)	50
بكتيريا أخرى	10
فطريات	20
اشنيات	1
طحالب	2
نباتات	15
حيوانات	2
~ 25000 تركيب من الطبيعة	

المضادات الحيوية العالمية (2001)	
النوع	**القيمة (بليون دولار أمريكي)**
السيفالوسبورين	6.7
البنسيلين	4.6
الشينولون (مصنّع)	4.6
ماكروليد	4.3
تتراسياكلين	0.7
أمينوغلايكوزايد	0.6
ببتيدات وببتيدات سكرية	0.5
أخرى	2.2
المجموع	24.2

التصنيف حسب البنية الكيميائية		
1 مضادات الحيوية الكربوهيدراتية	أمينوغلايكوزايدات	ستربتومايسين (طب)، كاسوغامايسين (مبيد فطري للأرز)
2 اللاكتونات ضخمة الحلقات	ماكرولايد	إريثرومايسين (طب)
	مضادات البوليين الحيوية	بايماريسين (pimaricin) (إنتاج الجبن)
	أنساميسين (ansamycines)	ريفامايسين (ضد السل)
3 الشينون (chinones) ومضادات حيوية ذات علاقة	تتراسايكلين	تتراسايكلين، كلوروتتراسايكلين (طب، مضاد حيوي علفي)
	أنثراسايكلين	دوكسوروبيسين (doxorubicin) (علاج السرطان)
4 مضادات الحيوية من الأحماض الأمينية والببتيدية الحيوية	مشتقات أحماض أمينية	سايكلوسبورين (زرع الأعضاء) فوسفونثريسين (phosphonothricin) (وقاية النبات)
	مضادات بيتا-لاكتام الحيوية	بنسيلين، سيفالوسورين (طب)
	مضادات ببتيدية حيوية	باكيتراسين (طب)، فيرجينامايسين (verginiamycin) (مضاد حيوي علفي)
	ببتيدات ملوّنة (chromopeptides)	أكتينومايسين (علاج السرطان)
	ببتيدات سكرية	بليومايسين (علاج السرطان، فانكومايسين (طب)، أفوبارسين (مضاد حيوي لعلف الماشية)
5 مركبات متباينة الحلقات بالنيتروجين	مضادات النيوكليوزايد الحيوية	بوليأوكسين (polyoxins) بلاستيسيدين S (blasticidin S) (مبيد فطري لوقاية النبات)
6 مركبات متباينة الحلقات بالأوكسيجين	مضادات البولي إيثر الحيوية	مونِنسين (monensin) (علف الدواجن)
7 مركبات حلقية مفتوحة (alicyclic compounds)	مشتقات الألكان الحلقي	سايكوهيكسيمايد (cycloheximide)
مضادات الحيوية العطرية	مشتقات البينزين	كلورامفينيكول (chloramphinicol) (طب)، غريسيوفالفين (griseofulvin) (مبيد فطري)



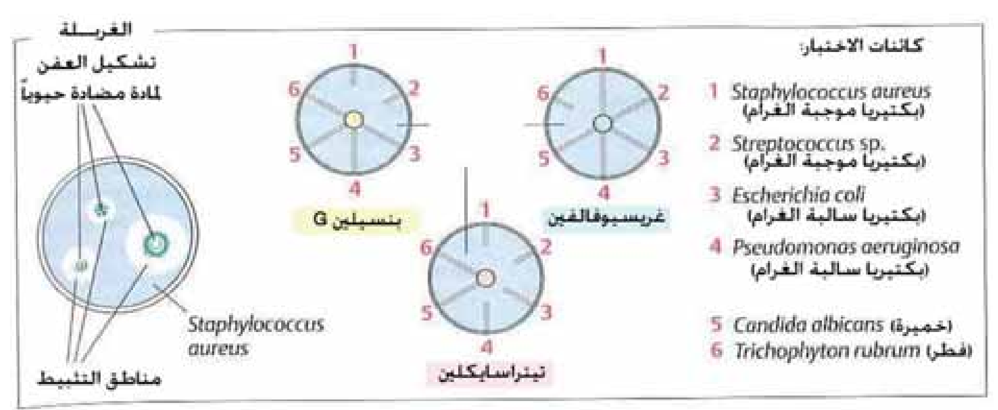
• مضادات الحيوية: الإنتاج الصناعي، المقاومة
(Anibiotics: industrial production, resistance)

الغربلة (Screening): تقليدياً يستخدم تثبيط نمو الكائن المجهري بوجود الكائن المنتِج مضاد الحيوية أو رشاحة مزرعته لاختبار المضاد. وإذا تم الكشف عن فعالية حيوية هامة، فإنه يجري تخصيب مضاد الحيوية هذا، ثم ينقّى من مرق المزرعة (culture broth) ليتم تحديد بنيته. ولكن إذا ما اتُّبِعَت هذه الإجراءات حالياً، فستتم عادةً إعادة اكتشاف مضادات حيوية المعروفة مرة جديدة. لذلك، ولزيادة عدد «الإصابات (hits)»، فقد تم تطوير العديد من أساليب الغربلة الجديدة. على سبيل المثال، يمكن استبدال اختبارات تثبيط النمو باستخدام الكائنات المجهرية بمعايرات أخرى كيمو حيوية أو حيوية (بيولوجية)، أو تحليل رشاحات مزارع السلالات التي يبدو أنها تكوِّن المضادات وذلك بأساليب كيميائية، أو استعمال الطرائق الاستهدافية (مثلاً، متابعة عملية تثبيط الأنزيم الميكروبي المتعلق بالإمراضية من خلال معايرات متوازية على أطباق معايرة دقيقة (microtiter plates) بالنسبة إلى مستخلصات كاملة أو مجتزأة من الكائنات المجهرية.

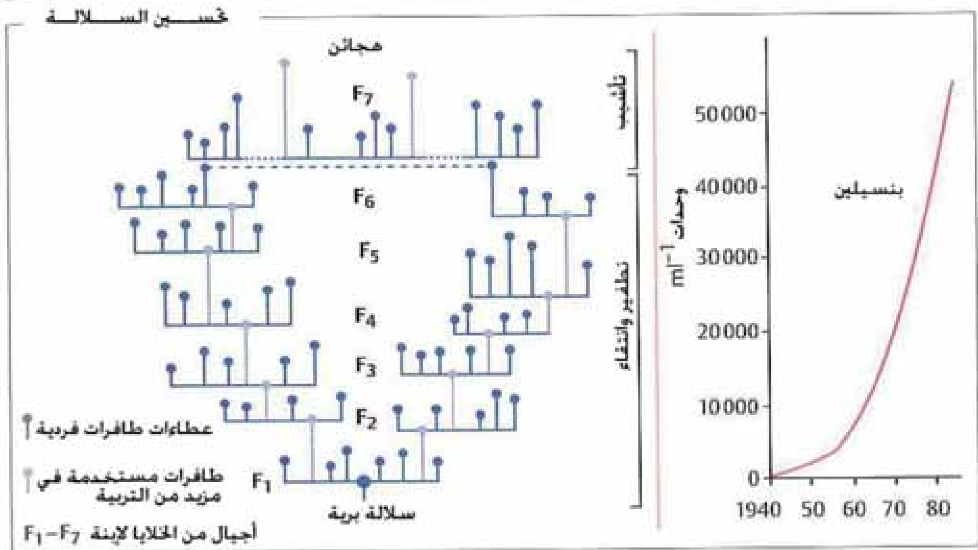
تحسين السلالة (Strain improvement): إذا تم تحديد أحد مضادات الحيوية الجديدة المهمة علاجياً، فإنه يجب أمثلة عطائه في مرحلة مبكرة؛ وذلك لأن مضادات الحيوية هذه هي في الحقيقة مستقلبات ثانوية، وبالتالي فإن تشكيلها من قبل الكائن الحي يكون بتراكيز منخفضة (عدة ميلليغرامات لكل ليتر من الزرعة أو أقل). تتبع عمليات تحسين السلالة عادة قواعد تجريبية تسودها تكرارات مُجهِدة في مجالي التطفير (mutation)، والانتقاء (selection). ويمكن أحياناً للتلقيح الراجع (back-cross) مع السلالة البرية أن يعزز تفعيل السلالات المنتجة. واعتماداً على طرق كهذه فقد ازداد عطاء بعض مضادات الحيوية الهامة اقتصادياً 10^3 ـ 10^6 ضعفاً مقارنةً بالعزلات (isolate) الأصلية. كما قادت تقنيات الهندسة الوراثية، مثلاً، من خلال زيادة عدد نسخ الجينات لأنزيمات أساسية، إلى تحسينات إضافية في العطاء.

عمليات التخمير والاسترجاع (Fermentation and recovery): إن المكونات الكيميائية لمعظم مضادات الحيوية غاية في التعقيد. فهي تحتوي عادة على عدة مراكز فراغية (stereo centers) ما يجعل التصنيع الكيميائي أمراً معقداً. وفي الحقيقة كان تصنيع كثير من مضادات الحيوية مثالاً رائعاً على التصنيع الكيميائي، لكنه لم يكن قابلاً للتطبيق الصناعي. ونتيجة لذلك، يتم الآن إنتاج معظم مضادات الحيوية عن طريق التخمير في مفاعلات حيوية. تُستخدم في هذه العملية مصادر كربون ونتروجين غير مكلفة مثل المولاس (molasses)، الدكستروز (dextrose)، مصل اللبن، فول الصويا، وشراب الذرة الحاد (corn steap liquor). ولأن معظم الكائنات المنتجة لمضادات الحيوية تتعرض للإعاقة من قبل المركبات الهادمة (catabilite repression)، فإن مصدر الكربون تتم إضافته في أغلب الأحيان بنمط الدفعة المغذات (fed-batch). كما أن طبيعة كون مضادات الحيوية مستقلبات ثانوية، فإن إنتاجها يبدأ فقط بعد أن يصل النمو الخلوي طور الاستقرار (stationary phase). إن مضادات الحيوية هي في العادة منتجات خارج خلوية (extracellular products)، وغالباً ما تكون قابلة للذوبان بالماء إلى حدٍّ ما. لذلك، يتم عزلها في نهاية عملية التخمير بإزالة الخلايا واستخلاص مرق الزرع (culture broth) بمذيبات عضوية (يمكن دمج هاتين الخطوتين في خطوة واحدة). ثم يمكن بعد ذلك تنقية المضاد الحيوي الخام المستخرج إلى حد أبعد بواسطة أساليب الكروماتوغرافيا المتنوعة أو بالبلورة (crystallization). ويخضع تصنيع مضادات الحيوية إلى تنظيمات صارمة وضوابط أمانية تتبع القواعد المعتمدة مثل ممارسة التصنيع الجيد (GMP) والـ ISO 9000.

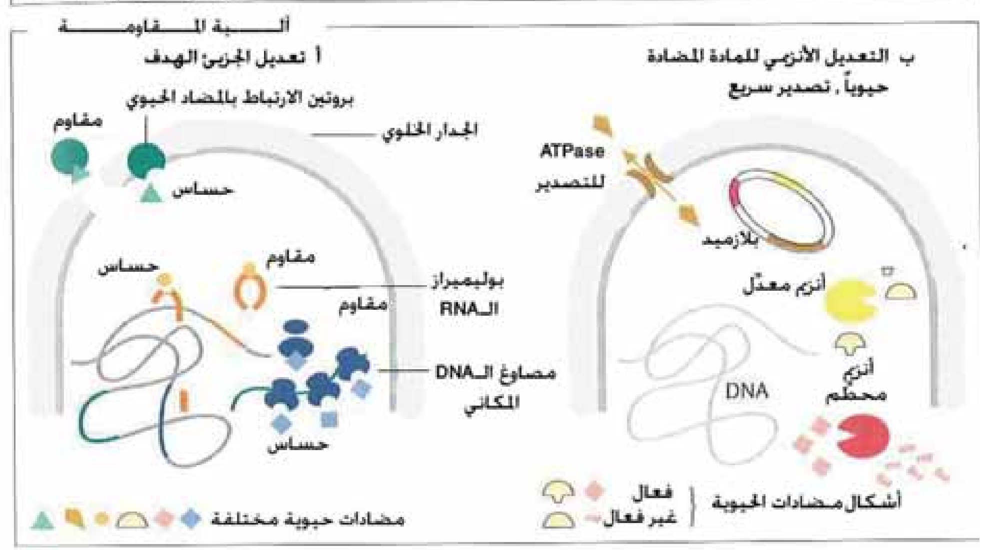
المقاومة (Resistance): تعتبر زيادة الميكروبات المقاومة لمضادات الحيوية مشكلة أساسية في الطب الحديث. والميكروبات المقاومة خلطياً (cross-resistance) (مثلاً، الكائنات المجهرية التي تقاوم عدة أو كثيراً من مضادات الحيوية) في تزايد مستمر بين الـ Salmonella، *Esherichia coli*، *coli*، Streptococci، Staphylococci والـــ *Mycobacterium tuberculosis* (التي تسبّب مرض السل). إن الآليات الأكثر أهمية المسؤولة عن المقاومة الميكروبية لمضادات الحيوية هي 1) تعديلات أنزيمية لمضاد الحيوية بحد ذاته (مثلاً، بالتحلل المائي (hydrolysis) أو الأسيَلة (acylation))، 2) عرقلة دخول مضاد الحيوية أو إعادة إخراجه بسرعة (مثلاً، بواسطة مضاد الساعي السيتوبلازمي (antiporter) أو تغيير نفاذية الأغشية)، 3) تعديل هدف مضاد الحيوية (مثلاً، من خلال تعديل موقع ارتباط المضاد على الرايبوزوم أو بتعديل آلية الترجمة (translation machinery)). هذه المقاومة إما أن يكون مشفراً عنها في الجينوم الميكروبي أو في عناصر وراثية متنقلة مثل البلازميدات (plasmids) أو عوامل التنقل الوراثية (transposons)، التي يمكن أن تؤدي إلى انتقال المقاومة أفقياً. كما تعتبر العاثيات وسيلة نقل أخرى لانتقال المقاومة بين السلالات المختلفة. هناك دعوات إلى خفض استعمال مضادات الحيوية في الزراعة (حيث تستعمل الكميات الأكبر من مضادات الحيوية في هذا المجال) وذلك للحد من انتشار المقاومة.



الغربلة
تشكيل العفن لمادة مضادة حيوياً
Staphylococcus aureus
مناطق التثبيط
بنسيلين G
غريسيوفالفين
تيتراسايكلين
كائنات الاختبار:
1 Staphylococcus aureus (بكتيريا موجبة الغرام)
2 Streptococcus sp. (بكتيريا موجبة الغرام)
3 Escherichia coli (بكتيريا سالبة الغرام)
4 Pseudomonas aeruginosa (بكتيريا سالبة الغرام)
5 Candida albicans (خميرة)
6 Trichophyton rubrum (فطر)



تحسين السلالة
هجائن
تأشيب
تطفير وانتقاء
عطاءات طافرات فردية
طافرات مستخدمة في مزيد من التربية
سلالة برية
أجيال من الخلايا لابنة F1–F7
بنسيلين
وحدات ml-1
50000
40000
30000
20000
10000
0
1940 50 60 70 80



آلية المقاومة
أ تعديل الجزيء الهدف
بروتين الارتباط بالمضاد الحيوي
مقاوم
حساس
الجدار الخلوي
بوليميراز الـRNA
مصاوغ الـDNA المكاني
مضادات حيوية مختلفة
ب التعديل الأنزيمي للمادة المضادة حيوياً، تصدير سريع
ATPase للتصدير
بلازميد
أنزيم معدّل
أنزيم محطم
DNA
أشكال مضادات الحيوية
فعال
غير فعال

• مضادات حيوية من بيتا ـ لاكتام: البنية، التصنيع الحيوي وآلية العمل (β-lactam antibiotics: structur, biosynthesis and mechanism of action)

عموميات (General). تعتبر مضادات الحيوية من بيتا ـ لاكتام (بينام (penams): بنيسيلين، سيفيم (cephems): سيفالوسبورينات (cephalosporins)) أكثر مضادات الحيوية أهمية من حيث القيمة والكمية، نظراً إلى ارتفاع فعاليتها، وانخفاض سمّيتها، وتنوع طرق تحويلها إلى مشتقات لاكتام شبه مصنعة (semi-synthetic). يصل إنتاجها السنوي إلى مستوى عشرات آلاف الأطنان؛ حيث تشكل السيفالسبورينات حوالى الثلث والبنسيلينات حوالى الخمس من سوق مضادات الحيوية الإجمالي. تستعمل مضادات الحيوية من بيتا ـ لاكتام حصرياً في التطبيقات الطبية، وبالمقابل تُستَعمل البنسيلينات أيضاً في الأدوية البيطرية. إن أكثر أشكال بيتا ـ لاكتام الأولية أهمية هما البينيسيلين G، (Penicillin G) والسيفالوسبورين C (cephlosporin C)، اللذان ينفعان كمادتي بدء لتصنيع البنسيلينات والسيفالوسبورينات شبه المصنعة. تضم المعايير الهامة في فعالية مضادات بيتا ـ لاكتام: الثباتية الحامضية (acid stability) (لإعطائها عن طريق الفم) والثباتية ضد أنزيمات بيتا β ـ لاكتاماز (β ـ lactamases)، التي هي أنزيمات يشفر (code) عنها في بلازميد (plasmid)، وهي العامل الرئيسي المسؤول عن المقاومة الميكروبية لمضادات اللاكتام الحيوية.

البنسيلينات (Pencillins): يشكل فطر *Penicillium chrysogenum* الآيزوبينيسيلين N، (isopenicillin N) كمنتج أولي الذي يحتوي على أحماض أمينية غير مولدة للبروتينات (nonproteinogenic amino acids) في سلسلته الجانبية لِـ (L- aminoadipic acid). وإذا تمت إضافة أحماض مثل حمض فينيل الخل (phenylacetic acid) إلى وسط الزرع في الطور اللوغاريتمي المتأخر، فإن أنزيم N ـ ترانسأستيلاز (N- transactylase) الفطري يحفز تجسيد هذه الأحماض في «بنسيلينات مصنعة حيوياً ذات خصائص دوائية مختلفة. إن البينيسيلين G، (Penicillin G) وحمض 6 ـ أمينوبينيسيلانيك (6- APA) وهو المركب الوسط الناتج من تحلل السلسلة الجانبية الحامضية، هما أكثر المواد الوسطية الهامة لإنشاء البنسيلينات شبه المصنعة.

السيفالوسبورينات (Cephalosporins): أدت معاينات الطبيب الإيطالي، غوسيب بروتزو (Giuseppe Brotzu)، إلى اكتشاف السيفالوسبورين C، (cephalosporin C) عام 1953، وهو أول ما جرى اكتشافه من أصناف مضادات االحيوية من بيتا ـ لاكتام. ويقوم بتشكيله فطر الـ Acremonium chrysogenum (اسمها السابق: Cephalosporium acremonium) الذي لا يحتوي على أنزيم N-transacetylase؛ وبالتالي، من المستحيل تحضير مشتقات السيفالوسبورين من مركبات الحمض السالفة المضافة. وعليه، تنتج معظم السيفالوسبرينات شبه المصنعة من المركبات الوسيطة المصنعة (synthetic intermediates) وهي أحماض 7 ـ أمينوسيفالوسبورانيك (7-ACA). تبدي سيفالوسبورينات الأجيال الثانية والثالثة فعالية واسعة ممتازة تجاه مدى واسع من الممرضات الموجبة الغرام والسالبة الغرام مع سمّيّة منخفضة للإنسان.

التصنيع الحيوي (Biosynthesis): يحتوي *P.chrysogenum* على تجمع (cluster) من ثلاثة جينات تشفر (code) لتصنيع الـ Isopenicillin N حيوياً. وبواسطة أنزيم التنشؤ (synthatase) واحد يتم جمع وحدات البناء لِـ L- aminoadipic acid وL-valine وL-cysteine في ببتيد ثلاثي الذي يُحوَّل بواسطة أنزيم synthetase آخر إلى isopenicillin N ثنائي الحلقة. كما يتيح أنزيم acyl-CoA: isopenicillin-N-acyl transferase، الذي يشفر له نفس تجمع الجينات بتبادل السلسلة الجانبية للحمض الأميني L-، (L-amino acids side chains) مع مدى واسع من مجموعات الأسيل (acyl) الأخرى. إن مسار التصنيع الحيوي للبينيسيلين يتوزع بين عدة أجزاء من الخلية. أما السيفالوسبورينات (cephalosporins) فيتم تشكيل في الـ *A.chrysogenum* من الوسيط isopenicillin N وذلك بعد التنتؤ الفوقي (epimerization) للسلسلة الجانبية للحمض الأميني، من خلال توسع حلقي تأكسدي محفز بأنزيم الإكسبنداز (expandase)، وإتباعها بتفاعلات على المستبدلات المتنوعة في حلقة اللاكتام والثايزين (thiazine). يسمح أنزيم O-acyltransferase الفطري بتعديل التفاعلات على الموقع 3- acetoxymethyl، لكن عدم توفر أنزيم N-acyltrasferase يمنع التفاعلات عند الرابطة 7-amide. وعلى عكس البينيسيليوم، فإن الجينات الخاصة بالتصنيع الحيوي لـ cephalosporinC تقع على اثنين من الصبغيات (الكروموزومات). لقد تم تنسيل (كلونة) جميع الجينات التي سبق ذكرها، حيث تجرى التجارب لتعديل تشكيل المنتج، وذلك من خلال الهندسة الوراثية والبروتينية.

آلية العمل (Mechanism): تقوم مضادات الحيوية من بيتا ـ لاكتام) بمنع تشكل الروابط الببتيدية المتشابكة خلال التصنيع الحيوي لجدار الخلية البكتيري (الميورين (murien)). وحيث إن الميورين هو المكون الأساسي للجدار الخلوي في الكائنات المجهرية الموجبة الغرام، فقد تبين بذلك سبب تخصص مضادات الحيوية من بيتا ـ لاكتام الأولى ضد هذه المجموعة من البكتيريا. وبما أن الإنسان والحيوانات الأكثر تطوراً لا تحتوي على الميورين فإن التأثير الجانبي لمضادات بيتا ـ لاكتام الحيوية محدود في التأثير في ميكروبات الجهاز الهضمي وتطور حساسية عرضية.

البنسيلينات

ثمالة الأسيل | حلقة بيتا-لاكتام | thiazolidine ring (حلقة ثايزوليدين)

حمض 6بيتا-أمينوبنيسيلانيك (APA)

الخصائص	الإسم	R
	أيزوبينيسيلين N	HOOC—CH(NH$_2$)—(CH$_2$)$_3$— (S)
غير مستقر حامضياً، حساس للبيتا-لاكتاماز	بنسيلين G	H$_5$C$_6$—CH$_2$—
مستقر حامضياً حساس للبيتا-لاكتامان فعال ضد المرضات سلبية الغرام	أمبيسيلين	H$_5$C$_6$—CH(NH$_2$)— (R)
مستقر حامضياً حساس للبيتا-لاكتامان يمثل مجموعة واسعة من المضادات الحيوية يعاد امتصاصه بشكل جيد	أموكسيسيلين	HO—C$_6$H$_4$—CH(NH$_2$)— (R)

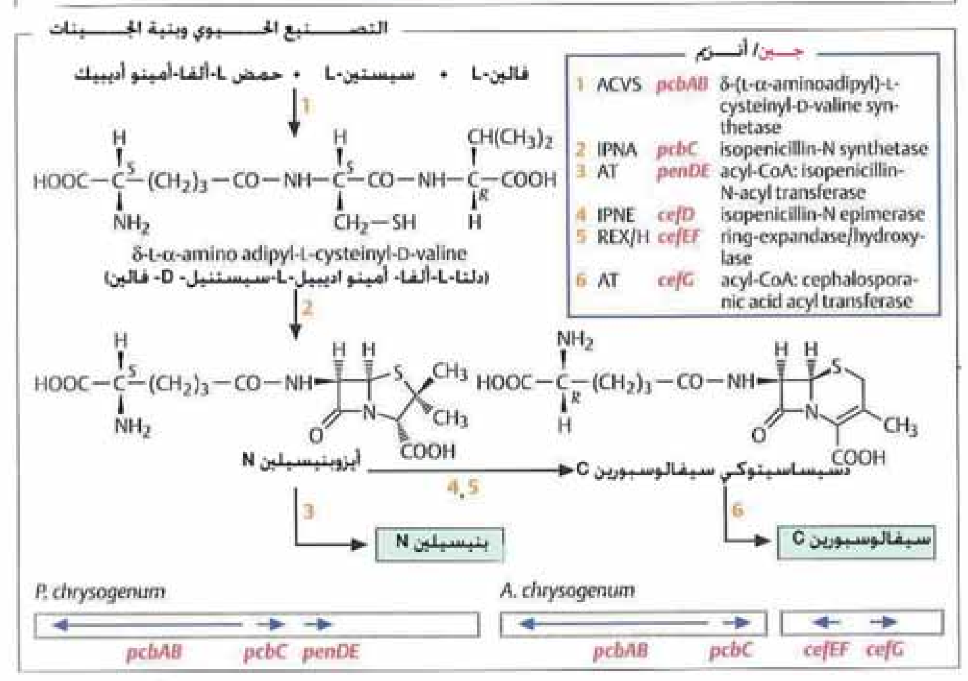
السيفالوسبورينات

ثمالة الأسيل | حلقة بيتا-لاكتام | حلقة داي هايدروثيازين

حمض 7بيتا-أمينو سيفالوسبورانيك (7-ACA, R^2 = CH$_2$—O—CO—CH$_3$)

حمض 7بيتا-دسيساسيتوكي سيفالوسبورانيك (7-ADCA, R^2 = CH$_3$)

الخصائص	الإسم	R^1/R^2
غير مستقر حامضياً حساس للبيتا-لاكتاماز	سيفالوسبورين C	HOOC—CH(NH$_2$)—(CH$_2$)$_3$— (R) CH$_2$—O—CO—CH$_3$
مستقر حامضياً مستقر تجاه بيتا-لاكتامان يمثل مجموعة واسعة من المضادات الحيوية	سيفاكلور	H$_5$C$_6$—CH(NH$_2$)— (R) Cl
مستقر حامضياً مستقر تجاه بيتا-لاكتمان ذو فعالة واسعة جداً	سيفوتاكسيم	H$_2$N-thiazolyl—C=N—OCH$_3$ (syn) CH$_2$—O—CO—CH$_3$

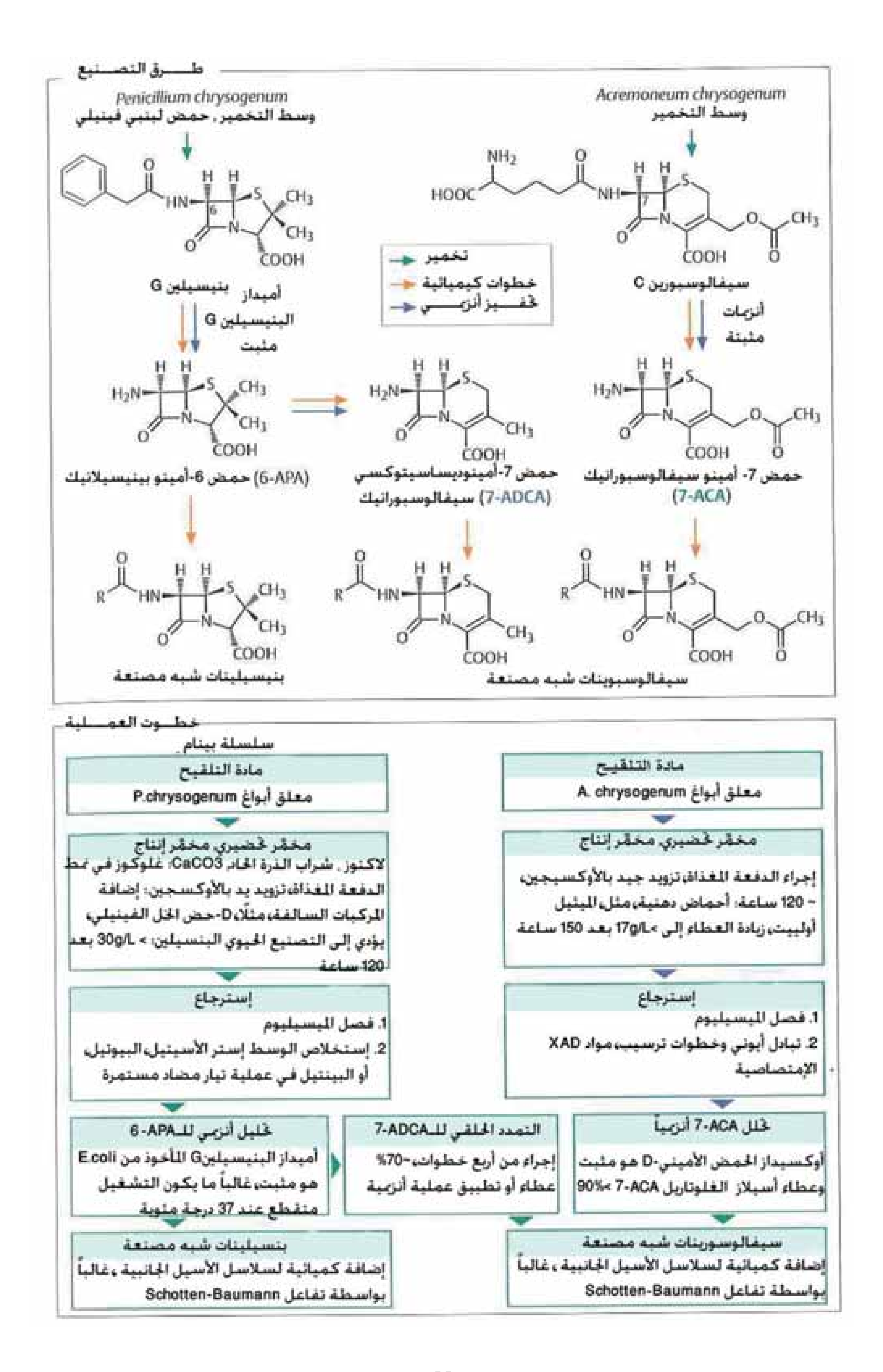


• مضادات الحيوية من بيتا ـ لاكتام: التصنيع
(β-Lactam antibiotics: manufacture)

تصنيع البنسيلينات (Penicillins): تحتوي حلقة بينام (Penam) في البنسيلينات على ثلاثة مراكز فراغية (stereocenters)، بحيث إن واحداً فقط من المصاوغات (isomers) التسعة المحتملة [3(S):5(R):6(R)] هي فعالة حيويا.ونتيجة لذلك، فإن عملية التخمير هي المفضلة من الناحية الاقتصادية مقارنةً بالتصنيع الكيميائي. تستعمل في عملية التخمير هذه سلالات عالية الأداء من فطر Penicillium chrysogenum. كما يمكن أن يضاف تشكيلة من المركبات السالفة (precursors) العطرية (aromatic) أو الدهنية (aliphatic) إلى وسط المزرعة، ما يؤدي إلى تشكيل «بنسيلينات مصنعة حيوياً» («biosynthetic penicillins»)؛ حيث تُنتَج فقط بنسيلينات G وV على مستوى ضخم، وذلك باستخدام حمض فينيل الخل (phenylacetic acid) أو حمض فينوكسي الخل (phenoxyacetic acid) على التوالي كمركبات سالفة. ويستعمل أيضاً كِلا البينيسلينات G وV في تصنيع حمض 6 ـ أمينوبينيسيلانيك (6-APA)، وهو المركب الوسيط الأساسي لتحضير البينسلينات شبه المصنعة وبعض السيفالوسبورينات (cephalosporins).

البنسيلين G والمركب 6-APA (حمض 6 ـ أمينوبينيسيلانيك): لإنتاج البنسيلين G على مستوى صناعي، تُنمَّى سلالات عالية الأداء من فطر P.chrysogenum في مفاعلات حيوية (bioreactors) ذات حجم يصل إلى $200\ m^3$. ولمنع إعاقات المركبات الهادمة (catabolite repression)، يضاف السكر بنمط الدفعة المغذاة (الدفعات) (fed-batch) في عملية التخمير. كما يعتبر تأمين الأكسيجين مسألة دقيقة تتطلب أمثلة الخفاقة ونظام التهوية لأن مجموعة الخيوط الفطرية المتشابكة ـ الميسيليوم ـ (mycelium) لزجة وحساسة للجز (shear). يمكن أن يحتوي مرق محلول التغذية المعقد على اللاكتوز (lactose) كمصدر للكربون، وشراب الذرة الكحولي الحاد (corn steep liquor) كمصدر للنيتروجين. أما البينيسلين فيتشكل بصورة أساسية بعد حوالى 40 ساعة، وذلك حينما يكون قد اكتمل نمو الفطر. فخلال طور الإنتاج البالغ حوالى 100 ساعة، يضاف حمض فينيل الخل (phenylacetic acid) إلى الوسط حيث يُفرز البينيسلين G من قبل الفطر. وعند اكتمال التخمير بالإمكان فصل الخيوط الفطرية المتشابكة ـ الميسيليوم ـ بالترشيح أو بالطرد المركزي (centrifugation)، ثم تستخلص الرشاحة خلال دقائق بواسطة اسيتات الأميل (amyl) أو البيوتيل (butyl) على 0-3°C ورقم هيدروجيني (pH) 2,5 ـ 3 باستعمال مُستخلِص متعارض التيار على مرحلتين أو بتطبيق إجراءات الاستخلاص المباشر باستخدام اثنين من المصفقات (decanters) يعملان بنمط التيار المتعارض. وبعد إعادة الاستخلاص، باستعمال الأمونيا (aqueous ammonia) أو الكربونات (carbonate) المائية، تتم تنقية المضاد الحيوي الخام (أكثر من 3 طن لمفاعل ذي حجم $110\ m^3$) بالتبلور (crystallization). بعد ذلك، يؤدي التحلل (hydrolysis) اللطيف اللاحق للرابطة الأميدية إلى تولد الـ 6-APA وحمض فينيل الخل الذي يمكن إعادة استخدامه في التخمير. ويعتبر 6-APA وسيطاً أساسياً لتحضير معظم البنسيلينات شبه المصنعة وبعض السيفالوسبورينات (cephalosporins). لقد حل خلال العقود القليلة الماضية التحلل الأنزيمي للبنسيلين G، باستعمال أنزيم أميداز البنسيلين G (penicillin G amidase) المثبت المأخوذ من بكتيريا E.coli، إلى حد كبير محل التحلل الكيميائي؛ الذي يُنفَّذ على حرارة 30 C؛ وpH 7,5 ـ 8 بنمط الدفعة المغذاة (الدفعات). وتسمح الثباتية العالية للأنزيم بتكرار هذه الخطوة حتى 1000 مرة قبل وجوب تغيير الأنزيم. كما يؤدي ترسيب الـ 6-APA وترشيحه وغسيله إلى منتج عالي النقاوة الذي تتم معالجته بشكلٍ إضافي ليشكل البنسلينات شبه المصنعة، أو الـ 7-ADCA وهو الوسيط الأساسي لبعض السيفالوسبورينات من خلال التوسيع (الكيميائي) الحلقي.

السيفالوسبورينات والمركب 7-ACA (حمض 7 ـ أمينوسيفالسبورانيك): تشبه إجراءات التخمير التي تقود إلى تشكل السيفالوسبورين C باستعمال فطر Acremonium chrysogenum تلك الإجراءات المستعملة في تصنيع البنسيلين G، لكن العطاء فيها أقل. إن فطر A.chrysogenum لا يحتوي على أنزيم N-transacetylase، وبالتالي لا يستطيع تشكيل سيفالوسبورينات مصنعة حيوياً. أما الـ 7-ACA فيُحضَّر من تحليل (hydrolysis) السيفالوسبورين C. وفي الأساليب الأنزيمية، التي يزداد تفضيلها لتوازنها البيئي المحبذ، فإنه يتم نزع مجموعة الأمينو تأكسدياً (oxidative deamination) من السلسلة الجانبية لِـ D-aminoadipyl في الـ 7-ACA ليتحول إلى - α-ketoadipyl-7-ACA، وذلك بفعل أنزيم D-amino acid oxidase المثبت. ثم يؤدي نزع الكربون (decarboxilation) التلقائي إلى الحصول على مركب glutaryl-7-ACA الذي منه يتم قطع سلسلة الغلوتاريل الجانبية (glutaryl side chain) بواسطة الأنزيم glutaryl-7-ACA-acylase المثبت. وقد تمت الإفادة عن أنزيمات سيفالوسبورين C أميداز (cephalosporin C amidases)، التي تستطيع أن تحلل سلسلة D-α - aminoadipyl الجانبية في خطوة واحدة، إلا أن تطبيقها على نطاقٍ واسع لم يجرِ بعد. كما تبين أن السلالات المهندسة وراثياً من P.chrysogenum تستطيع إنتاج السيفالوسبورين C وذلك إذا تم التعبير عن أنزيمات الإكسباندار/ هيدرولاز (expandase/hydroxylase)، المنسلة (المكلونة) من A.chrysogenum أو من Streptomyces clavuligerus، تحت سيطرة محضض (promrter) الـ β- tubulin وبوجود حمض الأديبيك (adipic acid).



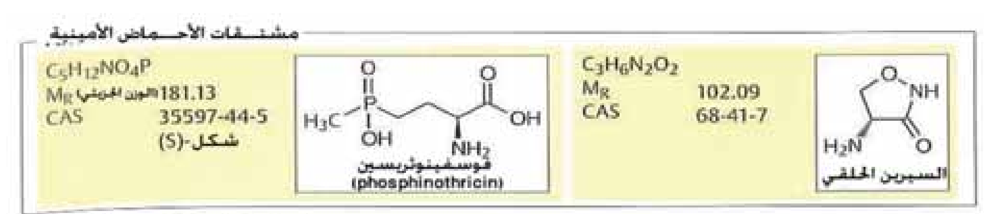
طرق التصنيع
Penicillium chrysogenum
وسط التخمير ، حمض لبني فينيلي
Acremoneum chrysogenum
وسط التخمير
تخمير
خطوات كيميائية
تحفيز أنزيمي
بنيسيلين G
أميداز البنيسيلين G مثبت
سيفالوسبورين C
أنزيمات مثبتة
حمض 6-أمينو بينيسيلانيك (6-APA)
حمض 7-أمينوديساسيتوكسي سيفالوسبورانيك (7-ADCA)
حمض 7- أمينو سيفالوسبورانيك (7-ACA)
بنيسيلينات شبه مصنعة
سيفالوسبورينات شبه مصنعة
خطوات العملية
سلسلة بينام
مادة التلقيح
معلق أبواغ P.chrysogenum
مادة التلقيح
معلق أبواغ A. chrysogenum
مخمر تحضيري مخمر إنتاج
لاكتوز ، شراب الذرة الخام CaCO3: غلوكوز في نمط الدفعة المغذاة، تزويد بالأوكسجين؛ إضافة المركبات السالفة، مثلاً D-حمض الخل الفينيلي يؤدي إلى التصنيع الحيوي البنسيلين: > 30g/L بعد 120 ساعة
مخمر تحضيري مخمر إنتاج
إجراء الدفعة المغذاة، تزويد جيد بالأوكسيجين، ~ 120 ساعة: أحماض دهنية، مثل الميثيل أوليت، زيادة العطاء إلى >17g/L بعد 150 ساعة
إسترجاع
1. فصل الميسيليوم
2. إستخلاص الوسط إستر الأسيتيل البيوتيل أو البينتيل في عملية تيار مضاد مستمرة
إسترجاع
1. فصل الميسيليوم
2. تبادل أيوني وخطوات ترسيب، مواد XAD الإمتصاصية
تحليل أنزيمي للـ6-APA
أميداز البنيسيلين G المأخوذ من E.coli هو مثبت، غالباً ما يكون التشغيل متقطع عند 37 درجة مئوية
التمدد الحلقي للـ7-ADCA
إجراء من أربع خطوات، ~70% عطاء أو تطبيق عملية أنزيمية
تحلل 7-ACA أنزيمياً
أوكسيداز الحمض الأميني-D هو مثبت وعطاء أسيلاز الغلوتاريل 7-ACA >90%
بنسيلينات شبه مصنعة
إضافة كميائية لسلاسل الأسيل الجانبية ، غالباً بواسطة تفاعل Schotten-Baumann
سيفالوسورينات شبه مصنعة
إضافة كميائية لسلاسل الأسيل الجانبية ، غالباً بواسطة تفاعل Schotten-Baumann

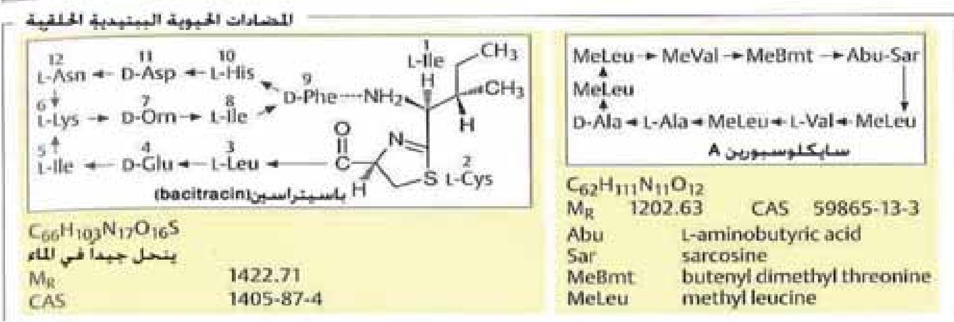
• مضادات الحيوية من الأحماض الأمينية والببتيدات
(Amino acid and peptide antibiotics)

عموميات (General). إن مضادات الحيوية من بيتا ـ لاكتام هي من أهم مضادات الحيوية العلاجية في الطب البشري وهي جرت مناقشتها أعلاه. ومن بين ما يجاوز الـ 5000 مضاد حيوي ناشئ عن أيض الأحماض الأمينية الثانوي، وُجد لبعض منها تطبيقات عملية في العلاج الطبي، وفي معالجة الجروح وفي الزراعة. تشمل مضادات الحيوية هذه: السيرين الحلقي (Cycloserine) والفوسفينوثريسين، ومضادات الحيوية حلقية الببتيد مثل الغراميسيدين، والباسيتراسين، والببتيدات المستخلبة (chelated peptides) مثل بليومايسين)، والبيبتيدات الملونة ـ كروموبيبتيد ـ (مثل الأكتينومايسين)، (مثل الفيرجينامايسين). إن الفالينومايسين هو مضاد حيوي يرتبط انتقائياً بأيونات البوتاسيوم (K^+). ولقد تم عزل العديد من هذه المضادات من سلالات الـ streptomyces، لكن بعضاً منها ينتج من الكائنات المجهرية موجبة الغرام الأخرى مثل الـ Streptococci والـ Bacilli.

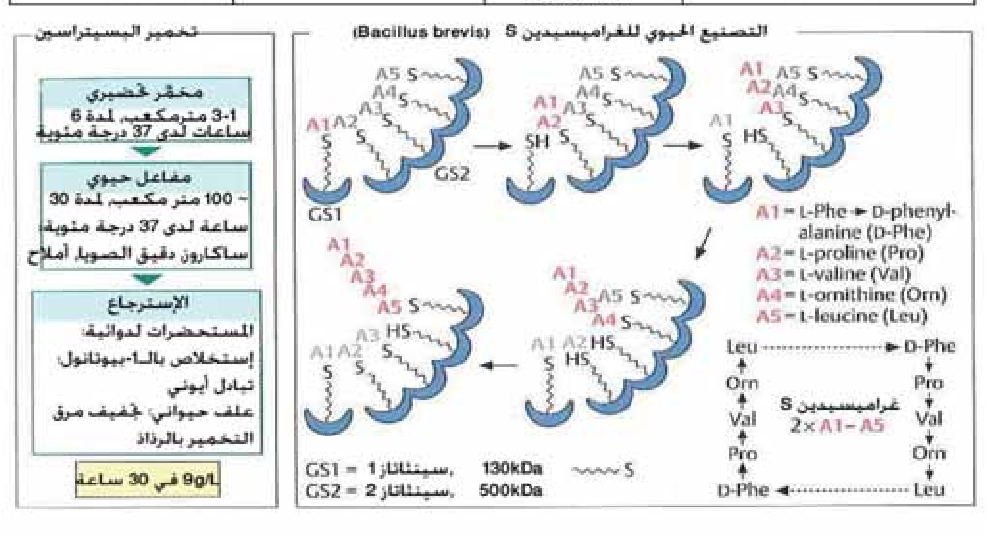
مشتقات الأحماض الأمينية (Amino acid derivatives): السيرين الحلقي ـ D (D-cycloserine)؛ الذي يصنَّع من قبل *Streptomyces orchidaceus*، هو نظير للألانين ـ D، (D-alanin)، أحد مكونات جدار الخلية البكتيري، كما أنه يثبط الألانين راسيماز، الأنزيم الأساسي في التصنيع الحيوي للميورين. ونظراً إلى فعاليته الممتازة ضد *Mycobacterium tuberculosis*، فقد كان، ولزمن طويل يحضر مندمجاً مع rafampicin، المضاد الحيوي المختار لمعالجة مرض السل. إنه مضاد الحيوية alanyl-alanyl phosphinothricine؛ الذي تم عزله أولاً من *Streptomyces hygroscopicus*، هو نظيرٌ لحمض الغلوتاميك ـ L ويثبط أنزيم تصنيع الغلوتامين في النبات. وأيضاً مضاد الحيوية و(Glyphosate® Basta®)، Phosphinothricine؛ الذي يُنتَج صناعياً بالتصنيع الكيميائي. في حالة تنسيل أنزيم الأسيتيل ترانسفيراز المأخوذ من *S.hygroscopicus*، ويتم التعبير عنه في النباتات الزراعية، فإن هذه النباتات تصبح مقاومةً للـ phosphinthricine بينما تبقى الأعشاب الضارة حساسة له.

مضادات الحيوية الببتيدية (Peptide antibiotics): يمكن تصنيعها إما من خلال التصنيع الحيوي الرايبوزومي أو التصنيع الحيوي غير الرايبوزومي. وتكون مضادات الحيوية الببتيدية الرايبوزومية عادة خطية (linear)، لكنها يمكن أن تخضع لتعديلات ما بعد الترجمة، مثلاً، عبرالتنتؤ الفوقي وتحول وضعية الأحماض الأمينية من L إلى D، مما ينتج منها مكونات حمض أمينية غير مولِّدة للبروتينات. والمثال على ذلك؛ مضاد الحيوية نيسين (nisin)، المنتج من قبل بكتيريا الـ Lactobacilli الموجودة بشكلٍ أساسي في جميع منتجات الحليب المتخمرة. فهو يحلل أغشية البكتيريا السيتوبلازمية، وبذلك يساعد على حفظ منتجات الألبان. أما الببتيدات غير الرايبوزومية فيجرى تصنيعها على العارضة الكبريتية (thio template) لمعقد منحل ذي أنزيمات متعددة مشابه لأنزيم تنشؤ ـ سينثاز ـ الأحماض الدهنية في الكائنات حقيقية النوى (eukaryotes). في هذا النظام يتم انتاج ببتيدات خطية قصيرة يمكن أن تُحوَّل إلى ببتيدات حلقية (مثلاً، الـ lantibiotics). وهي نادراً ما تحتوي أكثر من 20 وحدة بناء، وكثيراً ما تحتوي على أحماض أمينية غير عادية أو عناصر بنائية إضافية. ونظراً إلى سمّيّتها، يبقى استعمالها مقصوراً على التطبيقات الخارجية، مثل، معالجة الجروح والحروق. كما يستعمل الباسيتراسين كإضافة علفية. إن السايكلوسبورين مضاد حيوية يتم تصنيعه من قبل *Tolypocladium inflatum*، وهو الكابح المناعي المختار عند ازدراع الأعضاء أو النخاع العظمي. ولأنه يثبط عملية تفعيل الخلايا التائية (T-cells)، فإنه يستعمل أيضاً في بعض الأمراض الالتهابية المزمنة مثل التهاب الكلى، وداء كرون، والتهاب القولون التقرحي، والتهاب المفاصل الريثاني وأمراض أخرى. والكوليسترين وهو من (مايسينات البولي (polymycines))؛ التي تنتجها البكتيريا *Bacillus polymyxa*، وهو مضاد حيوية احتياطي هام ضد الإصابات بالكائنات المجهرية سلبية الغرام. والبليومايسين؛ الذي يُنتج من قبل (*Streptomyces verticillus*)، وهو من ضمن مضادات الحيوية المهمة المضادة للأورام. فمع قده مع الحديد Fe^{3+} بنسبة 1 : 1 وبوجود الأكسيجين يصبح شبيهاً بأنزيم الـ DNAase في عمله، فيقوم بتقطيع جديلات الـ DNA المنفردة (single DNA strands). أما الأكتينومايسين؛ المشتق الببتيدي للـ phenoxazinone، فيتم تشكيله بواسطة سلالات مختلفة من الـ streptomyes. وهو يدخل ضمن (intercalates) تسلسلات 5'-TGCA-3' المتناظرة (palindrome sequence) في الـ DNA، وبالتالي يوقف الترجمة. لذلك، استُعملت التأثيرات السمّيّة هذه لبعض الوقت في معالجة الأورام. الديبسي ببتيد؛ وهو من مضادات الحيوية التي تترابط وحدات البناء فيها من الأحماض الأمينية بالتناوب بواسطة روابط استيرية وأميدية. إنه مضاد الحيوية فعال بشكلٍ رئيسي ضد البكتيريا موجبة الغرام. الفيرجينامايسين؛ ويستعمل مضاد الحيوية المنتج من قبل Streptomyces Virginia، بكميات كبيرة في تسمين الخنازير والعجول. والسايدوروكروم؛ الذي هو مضاد حيوية ببتيدي، يحتوي أو يرتبط بالـ Fe كما يحتوي على مجموعات حمض الهيدروكساميك فيستعمل أحياناً لمعالجة أمراض تخزين الحديد.





مضاد الحيوية	الإنتاج	الكمية والقيمة، الولايات المتحدة		التطبيقات
فوسفينوثريسين (phosphinothricin)	تصنيع كيميائي			مبيد أعشاب
باسيتراسين A (bacitracinA)	*Bacillus licheniformis*	4 طن، 100 مليون دولار >200 طن، 20 مليون دولار		التأم الجروح مضاد حيوي علفي
بوليميكسين (polymyxin)	*Bacillus polymyxa*	25 مليون دولار	10kg	طبياً
غراميسيدين (gramicidin)	*Bacillus* أنواع		40g	طبياً
بليومايسين (bleomycin)	*Streptomyces verticillus*		2kg	علاج السرطان
سايكلوسبورين (cyclosorin)	*Tolypacladium inflatum*	3 طن، 130 مليون دولار		زرع الأعضاء
فرجينيامايسين (virginiamycin)	*Streptomyces virginia*	70 طن، 12–15 مليون دولار		تسمين الخنازير
فالينومايسين (valnomycin)	*Streptomyces fulvisimus*			حامل أيوني (ionophore)



• مضادات الحيوية من الببتيدات السكرية، والبولي إثير، والنيكليوزيدات الحيوية (Gycopeptide, polyethr, and nucleoside antibiotics)

عموميات (General). تشمل هذه المجموعة الببتيدات السكرية الهامة جداً من الفانكومايسين (vancomycin) الضرورية لمعالجة سلالات Staphylococcus aurens المقاومة للميثيسيلين (MRSA) (methicillin-resistant) («معالجة الخط الأول»)، ونظيرها الأفوبارسين (avoparycin) الذي يستعمل كإضافة علفية. والأمثلة الأخرى هي اللينكومايسين الغلايكوزيدي (glycoside lincomycin) الفعال جداً ضد البكتيريا المعوية موجبة الغرام (gram-positive)، ومضاد الحيوية في علف الدجاج المونِنسين (monensin)، الذي يبدي فعالية وقائية ضد الأوليات (protozoa). على الرغم من أن مضادات الحيوية النيوكليوزيدية موجودة طبيعياً، فإن نظائرها المصنعة (synthetic analogs) فقط هي التي تستعمل في العلاج، مثل، الأسيكلوفر (acyclovir) نظير الجوانوزين (guanosine analog) لمعالجة التهاب السحايا الفيروسي.

الفانكومايسين (Vancomycin) والأفوبارسين (Avoparcin): ينتج الفانكومايسين من قبل Amycolatopsis orientalis، وهي سلالة من الأكتينوميسات (Actinomyces). وهو يستعمل ضد بكتيريا المكورات الداخلية (Enterococci) المقاوِمة للبنسيلين، مثلاً، في مرض شغاف القلب التعفني وللمرضى ذوي الحساسية للبنسيلين. كما أنه بسبب سمّيّته للكلى واستعماله بصورة مندمجة مع مضادات حيوية أخرى سامة للكلى، كالأمينات السكرية (aminilycosides)، والسايكلوسبورين (cyclosporine)، فإن المراقبة الشاملة لتأثيرات السمّيّة الكلوية الجانبية مطلوبة حتماً. يشبه تأثير الفانكومايسين تأثير مضادات بيتا ـ لاكتام)، القائم على منع تصنيع الجدار الخلوي البكتيري (الربط ببتيد الموراميل UDP الخماسي (UDP muramyl pentapeptide))، حيث تشكل السلالات المقاومة ببتيدات سكرية للجدار الخلوي معدلة لا تتفاعل مع الفانكومايسين. إن هذا النوع من المقاومة يفترض بأن ينتقل أفقياً من خلال عوامل التنقل الوراثية (transposons) بين الإنسان والحيوانات البيتية. أما مضاد الحيوي الأفوبارسين (avoparcin) فينتج من قبل Streptomyces candidus، وقد كان يُستخدم في الأعلاف بكميات تفوق الفانكومايسين بحوالى 10 أضعاف. وعلى ضوء عزل عوامل وراثية اقترانية متنقلة التي تشفر للمقاومة ضد كل من الفانكومايسين والأفوبارسين، فإنه من المحتمل أن تنتقل مقاومة الفانكومايسين من خلال هذا المسار إلى سلسلة الغذاء البشري والمستشفيات. وهو الآن محظور في دول الاتحاد الأوروبي وأيضاً في الولايات المتحدة الأمريكية.

لينكومايسين (Lincomycin): وهو مضاد حيوي يُنتج بواسطة *Streptomyces lincolnensis*، فعال ضد الممرضات الموجبة الغرام ويستعمل في الطب البيطري. وعلى نحو مشابه بالكلورمفينيكول (chloramphenicol)، يرتبط هذا المضاد الحيوي بالوحدة الفرعية 50S من الرايبوزومات (ribosomes)، ما يمنع تطور السلسلة الببتيدية النامية. غالباً ما تظهر سلالات مقاومة للينكومايسين، وذلك إما من خلال انتاجها لـ RNA رايبوزومي (rRNA) معدَّل بإضافة مجموعة ميثيل (methylation) أو من خلال إزالة سمّيّته بتحولات أنزيمية.

مونانسين (Monensin): وهو مضاد حيوي بولي إيثري (polyether)، يصنع عن طريق تخمّر *Streptomyces cinnamoensis*. يجري تصنيعه حيوياً بواسطة البولي كيتايد (polyketides) باستخدام الأسيتات (acetate) والبروبيونات (propionate) والبيوتيرات (butyrate) كوحدات بناء. وهو يتحد كحامل أيوني (ionophore) في الأغشية فيسبب تحلّلاً تناضحياً (osmolysis) للخلايا من خلال تدفق أيونات الصوديوم (Na^+). هذه الآلية لا تؤثر فقط في البكتيريا والفطريات وإنما في الأوليات (protozoa) أيضاً، مثل، أنواع الـ Eimeria والـ Toxoplasma التي تنشأ خلال الإنتاج المكثف للحيوانات البيتية. وعلى الرغم من ارتفاع سمّيّته عند الإنسان والأحصنة (لكن ليس عند الدجاج والماشية)، فقد أصبح أحد أهم مضادات الحيوية ذات الطيف الواسع المستخدمة في أعلاف الدجاج بحيث يتم تحمله إذا استُخدم بجرعات مناسبة. هذا المضاد الحيوي هو مسجل في الاتحاد الأوروبي والولايات المتحدة، وتبلغ حصته في السوق من هذا التطبيق 80٪ مع الأخذ بالحسبان السالينومايسين (salynomycin) المشابه له من حيث البنية. يُنتج المونانسين بكميات تصل إلى عدة آلاف من الأطنان، ويجب الحذر عند استعماله من تسميم حيوانات أخرى كالأحصنة أو عمال المزارع.

مضادات الحيوية النيكليوزايدية (Nucleaside antibiotics) هي ذات استعمالات محدودة. يستعمل نظير السياتوزين (cytosine) وهو البلاستيسيدين S (blasticidin S) المنتج من قبل Streptomyces griseochromogenes كعامل مُحِد للنمو الفطري (fungistatic agent) لمعالجة آفات زراعة الأرز. فهو يمنع ارتباط الأمينوأسيل (aminoacyl) في الـ RNA المترجم (tRNA) بالرايبوزوم (ribosome). وهو سامٌ جداً للنبات والأسماك والحيوانات والإنسان، إذ يكمن تأثيره في الغشاء المخاطي، والجلد والرئتين. وهناك أيضاً مضاد حيوي مشتق من البيورين (purine derivative) هام في العلاج الطبي وهو الأسيكلوفر (acyclovir) المشتق المصنع للغوانوزين (guanosine)، والفعّال ضد فيروس القوباء (Herps virus) بحيث يمكن استعماله في حالة الالتهاب الدماغي الفيروسي (viral encephalitis). يتم الحصول عليه بواسطة التصنيع الكيميائي.

مضادات الببتيد السكري الغلايكوزيد والنيوكلوزيد الحيوية

أ فانكومايسن

ب بلاستوسيدين S

ج أسيكلوفر

د مونينسين

هـ لينكومايسين

	أ	ب	ج	د	هـ
	$C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$	$C_{17}H_{26}N_8O_5$	$C_8H_{11}N_5O_3$	$C_{36}H_{62}O_{11}$	$C_{18}H_{34}N_2O_6S$
M_R	1449.27	422.44	225.21	670.90	406.56
CAS	1404-90-6	2079-00-7	59277-89-3	17090-79-8	154-21-2

مضاد الحيوية	الإنتاج	الكمية والقيمة	التطبيقات
فانكومايسين (vancomycin)	*Amycolatopsis orientalis*		إصابات (عدوى) الإنسان
أفوبارسين (avoparcin)	*Streptomyces candidus*		مضاد حيوي علفي
مونينسين (monensin)	*S.cinnamonensis*	< 3000 طن، >200 مليون دولار أمريكي	علف الدواجن، فعال ضد الأوليات (protozoa)
بلاستيسيدين S (blasticidin S)	*S.griseochromogenes*		وقاية النباتات (مبيد فطري للآفات الزراعية)
أسايكلوفير (acyclovir)	Chemical synthesis		عامل مضاد للفيروسات
لينكومايسين (lincomycin)	*S.lincolnensis*		الطب البيطري



• مضادات الحيوية من الغلايكوزيدات الأمينية (Aminoglycoside antibiotics)

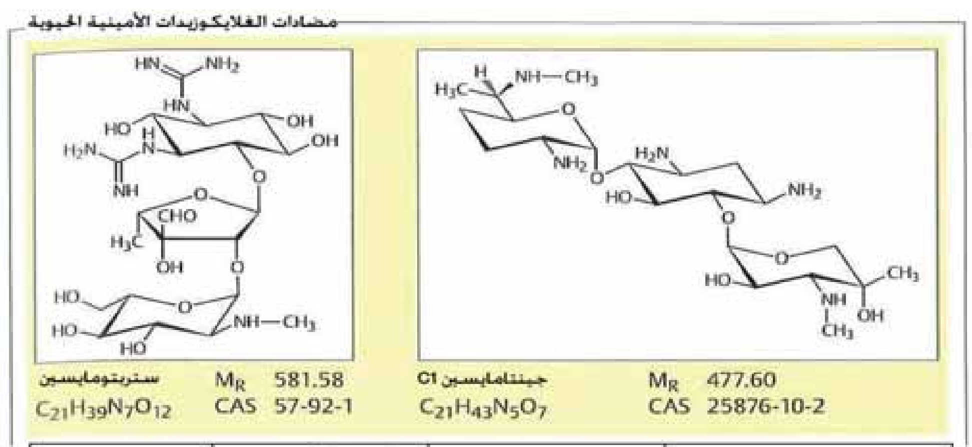
عموميات (General) . لقد كان اكتشاف الستريبتومايسين (streptomycin) من قبل سالمان واكسمان (1943) حجر الأساس في تطوير مضادات الحيوية. فقد سمح الستريبتومايسين، وللمرة الأولى في التاريخ، بمعالجة مرض السل الذي تسببه الـ *Mycobacterium Tuberculosis.* حالياً، أدت خصائص السمّيّة الكلوية (nephrotoxic) لدى الستوبتومايسين (التي هي نماذج لمضادات الحيوية من الغلايكوزيدات الأمينية) إلى استبداله بالـ isonicotinic acid hydrazide والريفامبيسين (وسابقاً بالسيكلوسيرين). إن البنية الأساسية (الفيصلية) (lead structure) لمعظم مضادات الغلايكوزيدات الأمينية الحيوية هي حلقة الأمينوسايكليتول، مثل الـ 2-deoxystreptamine الذي يرتبط بروابط غلايكوزيدية إلى سكريات أمينية أخرى. تبدي هذه المضادات فعالية حيوية واسعة، كما أنها فعالة ضد كثير من الممرضات سالبة الغرام. ونتيجة لذلك فهي المضادات المختارة لحالات الإصابات الحادة، وهي تحتل مكاناً موطداً في علاج الإنسان، على الرغم من ارتفاع سمّيّتها، ومن تشكل السلالات المقاومة لها. وتستعمل هذه المضادات أيضاً في وقاية النبات. تبلغ مبيعاتها في السوق العالمي حوالى 600 مليون دولار أمريكي، وأكثر مركباتها أهمية في علاج الإنسان هي الجنتامايسين، والنيومايسين، والتوبرامايسين، والكنامايسين والمنتجات شبه المصنعة كالسيسوميسين والأميكاسين. لا يزال الستريبتومايسين يستعمل بنجاح ضد إصابات السلالات المقاومة للبنسيلين من *Neisseria gonorrhoe* . أما الكاسوغامايسين فهو مضاد حيوي مهم زراعياً لمكافحة وباء الأرز، والكيغرومايسين مهم في الطب البيطري.

التصنيع الحيوي (Biosynthesis) : تتشكل مضادات الحيوية من الغلايكوزيدات الأمينية بشكل رئيسي بواسطة الكائنات المجهرية النوى (prokaryotes) التابعة للجنسين Streptomyces وMicromonospora . تبدأ دائماً عملية التصنيع الحيوي متعددة الخطوات (24 خطوة في الـ streptomycin) من الغلوكوز ذي الوضعية D (D-glucose)، وهي تقود عادةً، عبر سقالة من الغلايكوزيدات النيوكليوتايدية، إلى وحدة أمينوسايكليتول التي ترتبط غلايكوزايدياً بسكريات غير عادية (غلايكوزيدات أمينية، وسكريات متفرعة الكربون -C (branched sugars). تقع البروتينات الثلاثة والثلاثون المطلوبة في التصنيع الحيوي للستريبتومايسين على عنقود (تجمع) جيني واحد في جينوم الـ *Streptomyces griseus*، وهي تتألف من 30-40 bp حيث تم تنسيل معظمها.

الإنتاج (Production) : كما هو الحال بالنسبة إلى مضادات الحيوية المنتجة صناعياً، لقد خضعت سلالات الإنتاج لتحسينات سلالية هامة بواسطة سلسلة من عمليات التطفير (mutation) والانتقاء (selection) والتصالب الرجعي (back-crossing) . وقد رفعت مثل هذه الإجراءات العطاء من مضادات الحيوية في السلالات البرية، التي كانت بمستوى بضعة ميلليغرامات لكل ليتر (mgL^{-1})، إلى أكثر من 1000 ضعف (الستريبتومايسين: أكثر من 10 gL^{-1} بعد 120 ساعة تخمير). تُنَفَّذ عمليات الإنتاج الصناعي ضمن مفاعلات حيوية كبيرة، باستعمال الغلوكوز، النشاء أو الدكستران كمصدر للكربون ودقيق الصويا كمصدر للنتروجين. أما الغلايكوزيدات الأمينية التي تميل للارتباط بالخيوط الفطرية المتشابكة ـ الميسيليوم ـ، كالجينتومايسين (gentamicin)، فيمكن تحريرها من خلال تحميض الوسط إلى رقم هيدروجيني 2.0 (pH) . وبعد فصل الكتلة الخلوية بترشيح المرق أو بالطرد المركزي (centrifugation) وتركيز سائل التخمير، تتم تنقية المضاد الحيوي بواسطة عدة دورات على كروماتوغرافيا التبادل الأيوني (ion exchange chromatography) والبلورة (crystallization) .

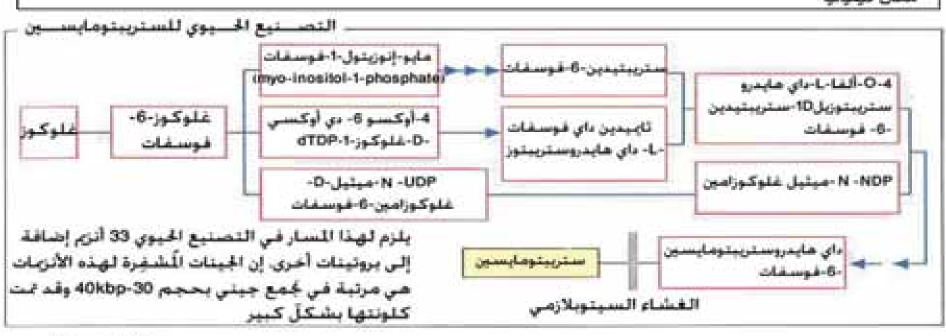
آلية العمل والمقاومة (Mechanism and resistance) : ترتبط مضادات الغلايكوزيدات الأمينية الحيوية بوحدات 30S الفرعية الرايبوزومية وتعترض عملية الترجمة، ما يؤدي بالنهاية إلى تثبيط التصنيع الحيوي للبروتينات. كما أن بعضاً منها يرتبط خصيصاً بإنترونات النوع I (type-I introns) من الـ RNA . إن العائق الرئيسي في هذه المضادات هو أنها تقود بسرعة إلى تشكيل صفات ظاهرية (phynotype) من المقاومة التي يمكن أن تُشفَّر (تكوَّد) على البلازميدات أو الصبغي. يمكن للسلالات المقاومة أن تعترض مجموعات الهيدروكسيل الأساسية من خلال الأستلة، أو الفسفرة، أو إضافة مجموعة الأدينيل، وبذلك تمنع ارتباط الغلايكوزيدات الأمينية بريبوزوماتها.

الغلايكوزيدات الأمينية شبه المصنعة (Semisyntetic amino glycosides) ذات الفعالية يمكن الحصول عليها من خلال الاشتقاق الكيميائي وبصورة مميزة عند المجموعات الأمينية. ومثالها السيسوميسين، الأميكاسين والتوبراميسين. لكن تجارب الحصول على غلايكوزيدات أمينية شبه مصنعة عبر هندسة المسارات (تصنيع حيوي اندماجي) قاد إلى نجاح محدود حتى الآن، على الرغم من أنه في عديد من الحالات تم تنسيل جميع جينات المسار التصنيعي، وتم تحضير كاسيتات التعبير المناسبة. لذلك من المفترض بأن عديداً من أنزيمات هكذا مسار تتعرض لتنظيم فردي معقد، مما يجعل التبادل فيها صعباً.



المضاد الحيوي	الإنتاج	المبيعات في 2001 (مليون دولار الأمريكي)	التطبيقات
ستربيتومايسين (streptomycin)	*Streptomyces griseus*		مجموعة واسعة من مضادات الحيوية ضد الـ Mcobacterium tuberculosum
جينتامايسين (gentamycin)	*Micromonaspora pupurea*		مجموعة واسعة من مضادات الحيوية
توبرامايسين (tobramycin)	*S.tenebrarius*	~ 600	مجموعة واسعة من مضادات الحيوية
أميكاسين* (amikacin)	*S. kanamyceticus*		مجموعة واسعة من مضادات الحيوية
نيتيليسين* (netilimicin)	*M. pupurea*		مجموعة واسعة من مضادات الحيوية
نيوماسين (neomycins)	*S. fradiae*		الإصابات الجلدية
كاسوغامايسين (kasugamycin)	*S. kasugaensis*		آفات الأرز
فاليدامايسين (validamycin)	*S. hygroscopicus*		زراعة الأرز

*معدل كيميائياً





*vvm : حجم هواء لحجم الخمر بالدقيقة

• مضادات الحيوية من التتراسايكلين، والشينون والشينولون، ومضادات عطرية أخرى (Tetracyclines, chinones, chinolones and other aromatic antibiotics)

عموميات (General). تعتبر التتراساكلينات (tetracyclines) مضادات حيوية هامة نظراً إلى مدى فعاليتها الواسع، وهي تستعمل في الطب والزراعة. والشينولونات (chinolones) هي نظائر مُصنِّعة لحمض الناليديكسيك (nalidixc acid)؛ وهي أيضاً فعالة ضد مدى واسع من المُمرِضات. يتم تحضيرها بالتصنيع الكيميائي وتشكل أحد الأصناف الأساسية من مضادات الحيوية الطبية بعد اللاكتام (قيمتها السوقية أكثر من 4 بليون دولار أمريكي عام 2000).

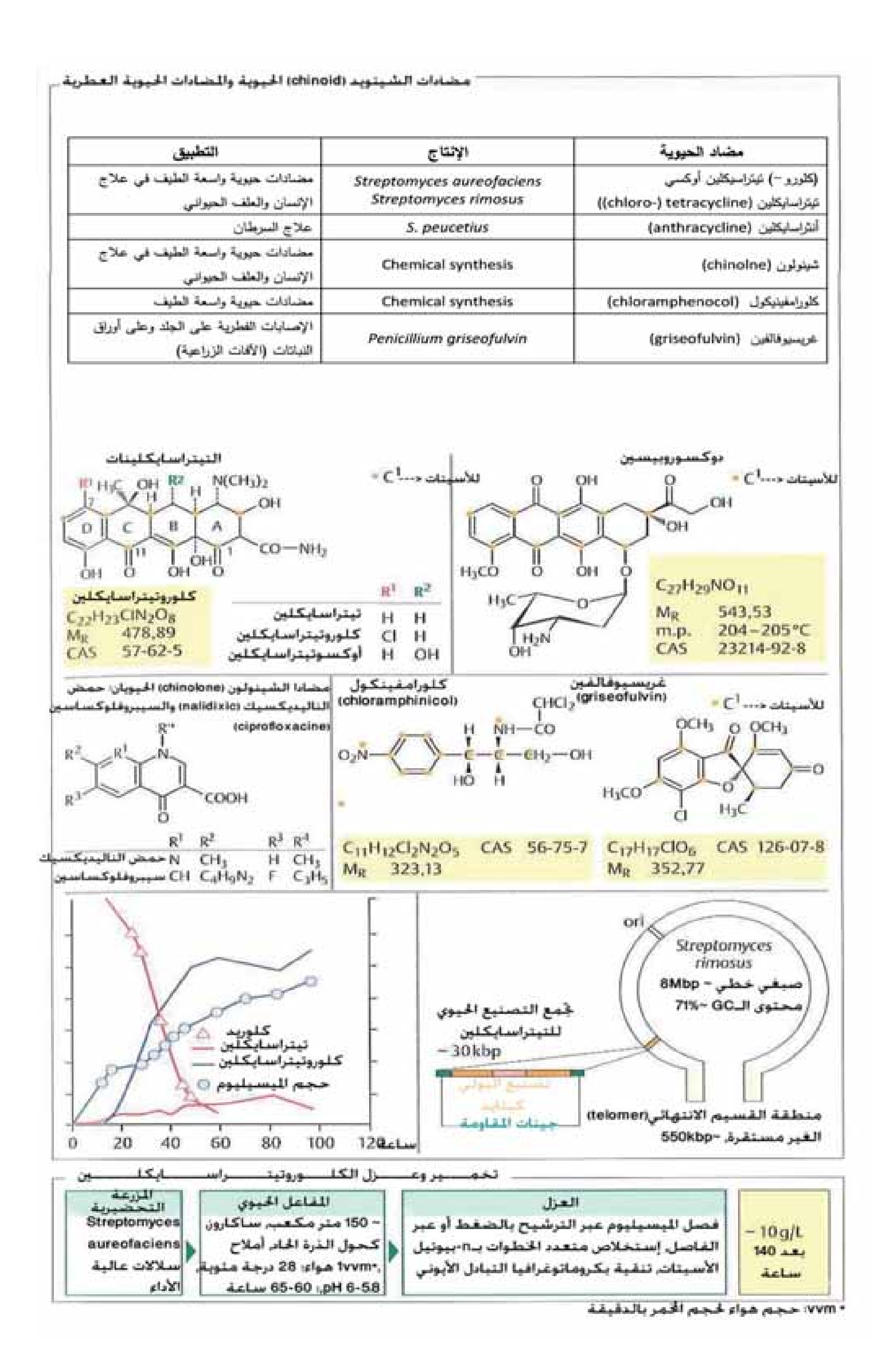
التتراسايكلينات (Tetracyclines): وُصفت لأول مرة عام 1945 كمستقلبات الـ *Streptomyces aureofaciens*. وبسبب انخفاض سمّيّتها واتساع طيف فعاليتها، فقد أصبحت من مضادات الحيوية الهامة جداً (قيمة سوقية عام 2000 أكثر من 600 مليون دولار أمريكي). فهي فعالة ضد البكتيريا موجبة الغرام (gam-positive) وسلبية الغرام (gram negative)، والركتيسيا (Rikettsia)، والمايكوبلازما (Mycoplasma)، والليبتوسبيرا (Leptospira)، والسبيروكيتا (Spirochaeta) وبعض الفيروسات الأكبر حجماً. إلا أنه، ولسوء الحظ، تُستَخدم التتراسايكلينات في بعض البلدان بكثرة كإضافة علفية لتسمين الدجاج والخنازير، مما أدى إلى تطور سلالات مقاومة. تضم آليات المقاومة هذه التي جرت ملاحظتها في أغلب الأحيان: انخفاض اختراق مضاد الحيوية الغشاء الخارجي للخلايا سلبية الغرام (بورينات معدلة (porines)) وتصنيع ما يسمى ببروتيات ـ تيت (tet-proteins)، من خلال الإشفار البلازميدي، التي تدعم إخراج التتراسايكلينات سريعاً من الخلية البكتيرية. تقوم التتراسايكلينات بتثبيط التصنيع الحيوي للبروتين بارتباطها بوحدات 70S الرايبوزومية. وهي تتشكل حصرياً في سلالات الـ streptomyces؛ حيث إن الناتج الأوَّلي عادةً هو الأوكسيتتراسايكلين (oxytetracycline). يتطلب تصنيعها الحيوي من الغلوكوز أكثر من 70 خطوة مستقلة، كما يتضمن مركبات وسيطة من البولي كيتايد (polyketide). وفي عملية إنتاجها الصناعي، تُزرع سلالات إنتاج مؤمثلة لعدة أنواع من الـ Streptomyces في مفاعلات حيوية كبيرة، حيث يمكن أن يصل العطاء فيها إلى أكثر من $25gL^{-1}$ إذا كان تأمين الأكسيجين مثالياً وتركيز الفوسفات في الوسط مضبوط بشكل جيد. ولعزلها تفصل الكتلة الخلوية ويستخلص الوسط باستخدام البيوتيل أسيتات (butyl acetate)، ثم تتم تنقيتها بكروماتوغرافيا التبادل الأيوني (ion exchange chromatography).

الأنثراسيكلين: (Anthracyclines) تقوم غلوكوزيدات الأنثراسايكلين كالدوكسوروبيسين (doxorubicin) (الأدرياماسيين (adriamycin)) بتثبط تضاعف الـ DNA من خلال إقحامها وتثبيطها للمصاوغ المكاني ـ أنزيم التوبوأيزوميراز ـ. تُستعمل هذه مضادات الحيوية في العلاج الكيميائي لمعالجة الأورام، ويتم إنتاجها بالتخمر.

الشينولون (Chinolones): حمض الناليديكسيك (nalidixic acid) هو منتج ثانوي في التصنيع الكيميائي للكلوروكوينون (chloroquinone)، كما أنه عامل مضاد للملاريا. لقد اكتُشف تأثيره القاتل للبكتيريا (bactericidal) عام 1962، ثم تبين عام 1977 أن ذلك يعود إلى تثبيط أنزيمات التوبوأيزويراز (topoisomerase) البكتيرية (الوحدة الفرعية A لأنزيم الجيراز (gyrase)). ولأن بنية أنزيم الـ topoisomerase البكتيري وكذلك وظيفته تختلف كثيراً عن الـ topoisomerase البشري، فإن الـ chinolones يبُدي سمّيّة منخفضة للإنسان. من جهة أخرى، يُبدي هذا المضاد الحيوي طيف فعالية واسعاً ضد البكتيريا الموجبة الغرام، والسالبة الغرام، والـ Mycobacteria، والـ Clamydia والكائنات المجهرية اللاهوائية. إن المقاومة ضده لا تتطور إلا ببطء وهي لا يُشفّر عنها بلازميدياً (plasmid-coded)، وإذا ما تطورت فإن ذلك يعود إلى تعديلات في وحدات أنزيم الجيراز الفرعية أو انخفاض نفاذية الأغشية. من بين أكثر من 5000 مشتق من الـ chinolone المنتجين حصرياً بالتصنيع الكيميائي، فقد وجد لبعضها فقط تطبيقات واسعة. والسيبروفلوكساسين (Ciprofloxacin) (Ciprobay®) هو مضاد حيوي من الـ chinolone فعال ضد ميكروب *Bacillus anthracis*.

الكلورامفينيكول (Chloramphenicol): تم عزله عام 1950 من مزارع *Streptomyces venezuelae*، لكنه اليوم يتم انتاجه كاملاً بالتصنيع الكيميائي. يتفرع مسار تصنيعه الحيوي ابتداءً من التصنيع الحيوي للأحماض الأمينية العطرية عند مستوى حمض الكوريزميك. يعمل هذا المضاد الحيوي من خلال الارتباط بوحدة 50S الفرعية لريبوزومات الـ 70S، ما يؤدي إلى تعطيل أنزيم البيبتيديل ترانسفيراز (peptidyl transferase). لقد كان أول مضاد حيوي واسع الطيف، فهو فعّال ضد مدى واسع من البكتيريا الموجبة الغرام، والسالبة الغرام، والـ Actinomycetes، والـ Rickettsia والفيروسات الكبيرة. ولأنه يحطم النخاع العظمي، فإنه يستعمل كمضاد حيوي احتياطي خاصةً لمعالجة التيفوس (typhus) والشيغلا (shigellosis) وإصابات الركتيسيا (Rickettsia).

الغريسيوفلفين (Griseofulvin): وهو مشتق من البينزوفينون (benzophenone)، يقوم بحد نمو الفطور (fungistatic) فيوقف انقسامها الفتيلي (mitosis) عن طريق الارتباط بالمغزل (spindle) الفطري الذي يلاحظ من خلال تشكيل غُصينات (hyphae) قصيرة مجعدة. يُنتج هذا المضاد الحيوي بالتخمير. وتضم تطبيقاته معالجة الإصابات الجلدية الفطرية (dermatomycosis) واستعماله زراعياً كمبيد فطري على أوراق النباتات ضد آفات زراعية.



مضادات الشينويد (chinoid) الحيوية والمضادات الحيوية العطرية

مضاد الحيوية	الإنتاج	التطبيق
(كلورو –) تيتراسيكلين أوكسي تيتراسايكلين ((chloro-) tetracycline)	*Streptomyces aureofaciens* *Streptomyces rimosus*	مضادات حيوية واسعة الطيف في علاج الإنسان والعلف الحيواني
أنثراسايكلين (anthracycline)	*S. peucetius*	علاج السرطان
شينولون (chinolne)	Chemical synthesis	مضادات حيوية واسعة الطيف في علاج الإنسان والعلف الحيواني
كلورامفينيكول (chloramphenocol)	Chemical synthesis	مضادات حيوية واسعة الطيف
غريسيوفالفين (griseofulvin)	*Penicillium griseofulvin*	الإصابات الفطرية على الجلد وعلى أوراق النباتات (الآفات الزراعية)

مضادات الحيوية من الماكرولايد

(Macrolide antibiotics)

عموميات (General). تشمل هذه المجموعة الهامة من مضادات الحيوية الماكرولايد، والبوليين، والماكروتيترولايد والأنساميسين. وهي تشترك باحتوائها على اللاكتون الحلقي الضخم أو حلقة اللاكتام (lactam ring) المتشكلة من حمض دهني طويل السلسلة متعدد الهيدروكسيل ومجموعة هايدروكسيل أو أمينو طرفية. يمكن لهذه الحلقة أن يكون مضافاً إليها مجموعة غلايكوزيل من السكريات غير العادية (كالـ macrolides)، أو تكون محتوية على روابط اقترانية مزدوجة (كالـ polynenes) أو على حامل لوني عطري (كالـ ansamycine)، أو أن يتم بناؤها كبولي لاكتون (كالـ macrotetrolides). إن معظم البولي كيتايدات يتم انتاجها من سلالات الـ Streptomyces، وهي تُستعمل في علاج الإنسان، وأيضاً من أجل حماية الغذاء والأعلاف. تبلغ القيمة السوقية للـ macrolides المستعملة في المجال الطبي حوالى 4,3 بليون دولار أمريكي (2000) أو حوالى 5/ 1 من الإنتاج الإجمالي للمضادات الحيوية.

مضادات الماكرولايد الحيوية (Macrolide antibiotics) هي مركبات محبة للدهون (lipophilic) وغالباً ما تكون قلوية. إن العنصرالبنيوي الأساسي في هذه المركبات هو حلقة اللاكتون الضخمة المؤلفة من 10 ـ 60 ذرة، وهي تتشكل بواسطة معقد متعدد الأنزيمات يشبه أنزيم تنشؤ ـ سينثاز ـ الأحماض الدهنية، عبر تكثف وحدة البدء، الأسيل ـ كو A (acyl-CoA)، مع المالونيل ـ كو A أو مثيلاتها الميثيلية أو الإيثيلية. تشكل البولي كيتايدات في هذا التفاعل الوسائط الافتراضية التي يتم تعديلها إلى حد أبعد بسكريات غير عادية محتوية مثلاً على مجموعات أمينية، وتفرعات ميثيل كربونية ومجموعات دي أوكسي. تُبدي مضادات الماكرولايد الحيوية سمّيّة منخفضة، وهي تُستعمل غالباً في طب الأطفال. تثبط هذه المضادات بشكل خاص الكائنات المجهرية موجبة الغرام من خلال ارتباطها بالوحدات الفرعية 50S الرايبوزومية، معرقلة بذلك نقل السلسلة الببتيدية النامية. في أغلب الأحيان يلاحَظ تشكل ممرضات مقاومة، وذلك غالباً بسبب إضافة الميثيل على وحدة الـ RNA الفرعية 23S الرايبوزومية. إن الإريثرومايسين والسبيرامايسين هما مضادان حيويان مفضلان ضد الإصابة البكتيرية للجهاز التنفسي. كما أن التايلوسين الذي يرجع للماكرولايد، كان مضاداً حيوياً قيماً في الأعلاف من أجل تسمين الخنازير، وذلك لفعاليته المضادة للمايكوبلازمات. إلا أنه بسبب تطور سلالات مقاومة تصالبياً نتيجة استعماله، فقد تم حظر استخدامه في معظم دول أوروبا الشمالية من الاتحاد الأوربي.

مضادات الحيوية من البوليين (Polyene antibiotics) تتشكل تفضيلياً بواسطة سلالات الـ Streptomyces. وهي تمتلك حلقات لاكتون ضخمة مؤلفة من 26 إلى 38 ذرة مع وجود 3 إلى 7 روابط اقترانية مزدوجة، كما يمكن أن تحتوي على وحدات بناء إضافية مثل السكريات الأمينية المرتبطة برابطة غلايكوزيدية. هناك عدة مضادات حيوية من البوليين تُستخدم كعوامل مُحِدة لنمو الفطور (fungistatic)، مثل، الأمفوترسين B أو النيستاتين المستخدمين في العلاج الطبي لإصابات الـ *Candida albicans*، والبيماريسين كمادة حافظة للطعام يُستخدم في الأجبان. تعمل مضادات البوليين بتكوين معقدات مع ستيرولات الأغشية الفطرية كالإرغوستيرول، وبالتالي فهي غير فعالة ضد البكتيريا. وبسبب سمّيّتها الكلوية (nephrotoxic) والكبدية (hepatotoxic)، فإن استعمالها محصور في حالات الإصابة الشديدة. كما أنها غير ثابتة لكي تستعمل كمبيدات فطرية في الزراعة.

الأنساميسين (Ansamycins): وهي مضادات حيوية تمتلك حلقات لاكتام ضخمة، وتحتوي على حامل لوني عطري. يتم انتاج الريفامايسين، وهو المضاد الحيوي الأكثر أهمية في التمثيل عن الأنامايسينات، في *Nocardia mediterranet*. فهو فعال جداً ضد بكتيريا الموجبة الغرام والـ Mycobacteria. تتضمن عملية تصنيعه الحيوية تجميع البولي كيتايد بإضافة وحدات امتداد من سلسلة الأسيتات والبروبيونات إلى وحدة بدء فريدة وهي 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA)، الذي يتشكل بواسطة مسار يشبه مسار تشكيل حمض الشيكميك. أما الريفامبيسين، المشتق شبه المصنع للـ refamycin، فهو حالياً أكثر مضادات الحيوية استعمالاً لمعالجة السل (الممرض: *Mycobacterium tuberculosum*)، كما يُستعمل أيضاً لمعالجة الجذام (البرص) أو مرض Hansen (*Mycobacterium leprae*). يعمل هذا المضاد الحيوي عن طريق ارتباطه بوحدة بيتا الفرعية لأنزيم بوليميراز الـ RNA البكتيري (RNA-polymerase) المعتمد على الـ DNA ما يؤدي إلى تثبيطه. ولأن الـ rifampicin لا يرتبط ببوليميراز الـ RNA البشري فإنه غير سام للإنسان. وتنشأ السلالات المقاومة من جراء التطفيرات التي تطرأ على بوليميراز الـ RNA ما يؤدي إلى تعديله.

عمليات التخمير والتنقية (Fermentation and purification): تُنتج مضادات الماكرولايد الحيوية الهامة تجارياً في الصناعة بواسطة سلالات عالية الإنتاج داخل مفاعلات حيوية كبيرة. على سبيل المثال، يبلغ العطاء من الإريثرومايسين بواسطة *Saccharopolyspora erythraea* (الاسم القديم *Streptomyces erythreus*) مستوى $7gL^{-1}$ بعد 72 ساعة من بدء التخمير. بعد ذلك، تتم إزالة الكتلة الخلوية بالترشيح أو الفرز، ثم يتم عزل المنتجات الخارج خلوية (extracellular) من خلال الاستخلاص بالمذيبات، وفي النهاية تتم تنقيتها أكثر بواسطة الكروماتوغرافيا.

مضادات البولي كيتايد الحيوية

a إيريثرومايسين

b ريفامبيسين (rifampicin): R = CH=N–N(piperazine)N–CH₃

c ريفامايسين (rifamycin): R = H

d أمفوتيريسين B

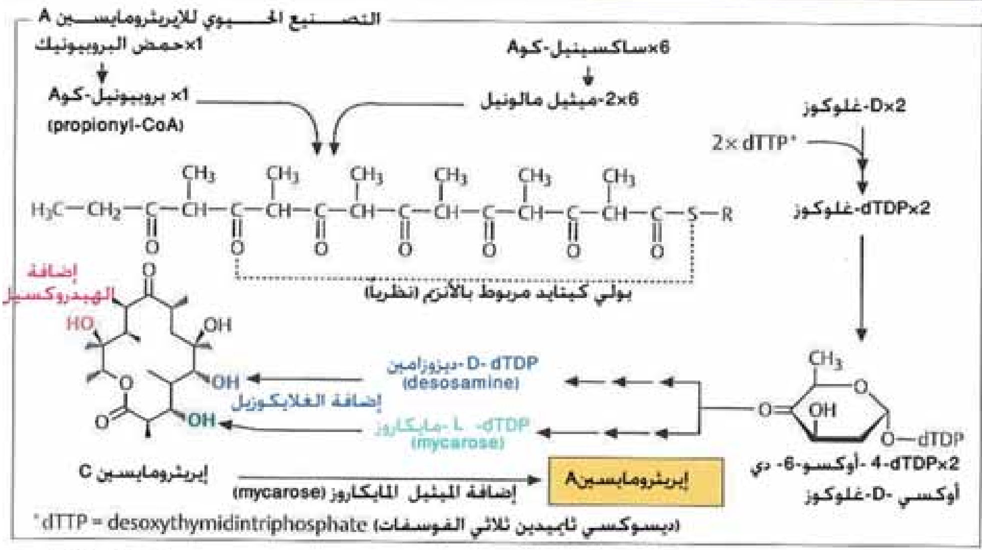
a $C_{37}H_{67}NO_{13}$, M_R = 733.94, CAS 114-07-8

b $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$, M_R = 822.95, CAS 13292-46-1

c $C_{37}H_{47}NO_{12}$, M_R = 697.78, CAS 6998-60-3

d $C_{47}H_{73}NO_{17}$, M_R = 924.09, CAS 1397-89-31

التصـــــنيع الحيـــــوي للإيريثرومايســـين A



التصـــــنيع



• مسارات جديدة لمضادات الحيوية

(New pathway to antibiotics)

عموميات (General). على الرغم من أن العلاج بمضادات الحيوية قد غدا قصة نجاح، ويجري عزل المزيد من مضادات الحيوية الجديدة سنة بعد أخرى، إلا أن الإصابات التي كان يُعتقد أنها انقرضت عادت للظهور وثبت أنها أصعب علاجاً. تُمثل فقط عودة ظهور مرض السل أحد هذه المشاكل، بالإضافة حتى إلى معالجة إصابات تسببها الـ Staphylococci والـ Streptococci التي يمكن أن تكون صعبة هذه الأيام. يكمن أساس هذه المشكلة في مقاومة البكتيريا لواحد أو أكثر من مضادات الحيوية (المقاومة المتصالبة «cross-resistance») التي تشكل تحدياً طبياً وعلمياً أساسياً. فمقاومة مضادات الحيوية غالباً ما يُشفر عنها على بلازميدات أو عوامل التنقل الوراثية (transposons) بحيث يمكن أن تنتقل هذه الصفة أفقياً بين كائنات مجهرية مختلفة، مثلاً، من خلال الإصابات بفيروس العاثية (phage). أما المشكلة الحاسمة الأخرى فتتجلى في العدد القليل نسبياً للمضادات الحيوية الفعالة ضد الفطريات الممرضة والخمائر غير السامة للإنسان. كما أنه بسبب كون عمليات الأيض في الخلايا حقيقية النواة (eukaryotes) متقاربة جداً، فإن مضادات الحيوية التي تؤثر في الفطريات عادةً ما تكون سامة للإنسان أيضاً. وكنتيجةٍ لذلك، فإن هناك مبررات جيدة للبحث عن مبادرات جديدة في اكتشاف مضادات الحيوية.

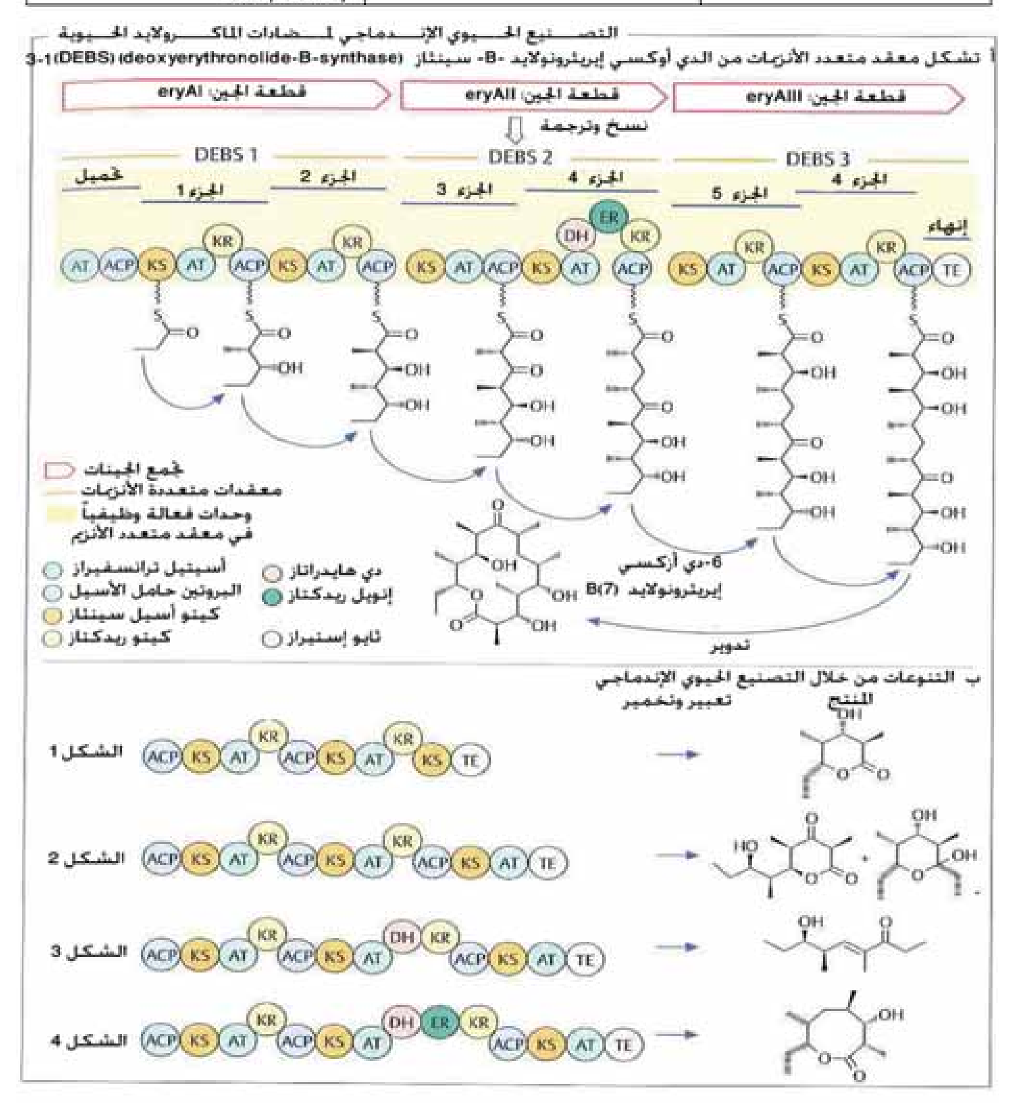
إجراءات الغربلة الجديدة (New screening procedures): حين تستعمل إجراءات الغربلة النموذجية، مثل المعايرات الحيوية، في اكتشاف مضادات حيوية جديدة فإن تسعاً من أصل عشر محاولات ستعطي بُنى لمضادات سبق أن وصفت. ونتيجة لذلك، فقد طُور نطاق من الأساليب غير التقليدية لاكتشاف بنى جديدة. وأهم الأمثلة على ذلك هي: 1) التصنيع الحيوي الموجَّه بالمركبات السالفة (directed-precursor)، حيث إن إضافة مركبات سالفة مصنعة إلى عملية التخمير تؤدي إلى التصنيع الحيوي للمضادات الحيوية، 2) غربلة مضادات الحيوية في الأجناس التي لا تزال مهملة كالـ Myxobacteria أو الـ Actinomycetales النادرة، أو اللشنيات (lichens) أو الإسفنجيات (sponges)، 3) تعديل أساليب الغربلة اعتماداً على معايرات جديدة، 4) البحث عن وسائط (intermediates) فعالة في التصنيع الحيوي لمضادات الحيوية، 5) البحث عن وسائط جديدة بالوراثة المعكوسة (reverse genetics)، 6) تأشيب عناقيد (تجمعات) الجينات ذات العلاقة من خلال الاندماج (الانصهار) الخلوي، 7) تأشيب عناقيد (تجمعات) الجينات ذات العلاقة بالتصنيع الحيوي الاندماجي (combinatorial) لها في الزجاج (الخلط الجيني gene shuffling)، و8) البحث عن أهداف متخصصة بالكائن الممرض من خلال استعمال المعلومات الجينومية ووسائل المعلوماتية الحيوية.

الوراثة المعكوسة (Reverse genetics): بعد المعرفة الكافية بتسلسل الأحماض الأمينية والنيوكلوتيدات للأنزيمات التي تحفز (catalyse) خطوات نموذجية في التصنيع الحيوي للمضادات الحيوية، فإنه من الممكن استعمال التسلسلات الإجماعية (consensus sequences) لهذه الأنزيمات لغربلة الفعاليات المكافئة في DNA جينوم السلالات ذات العلاقة. وقد استعمل هذا الأسلوب بنجاح في غربلة بنى غير عادية من البولي كيتايد (polyketide) ضمن مضادات الماكرولايد (macrolide) الحيوية.

التصنيع الحيوي الاندماجي (Combinatorial biosynthesis): تعتبر المسارات النموذجية في التصنيع الحيوي القائمة على الاتحاد المتكرر لوحدات كربون ثنائية (C_2)، ثلاثية (C_3) ورباعية (C_4) مع سلسلة البولي كيتايد (polyketide) النامية، مناسبة بشكل خاص في التجارب الوراثية الاندماجية. إن الجينات المطلوبة في تصنيع الماكرولايدات (macrolides) هي منظمة في العادة كنماذج قليلة على طول مشغل حيوي ـ أوبرون ـ (operon) واحد والذي يمكن أن يُحوَّل إلى بلازميد ما يؤدي إلى توفر فرص مشجعة لاستعمال الخلط الجيني (gene shuffling). وبهذا الأسلوب فقد تم عزل بولي كيتايدات جديدة ذات فعالية مضادة للميكروبات لم يسبق أبداً عزلها من الطبيعة.

إستهدافات جديدة من التحليل الجينومي: تزداد أعداد الكائنات المجهرية الممرضة التي تمت سلسلة جينومها بشكل كامل سنة بعد أخرى. وبذلك فقد تم الكشف عن جينوم كل من *Hemophilus influenzae* (1.83Mbp؛ الالتهاب الرئوي المزمن)، *pylori Helicobacter* (1.67Mbp؛ القرحة)، *Borrelia burgdorferi* (0.91Mbp؛ داء لايم)، *Mycobacterian tuberculosum* (4.41Mbp؛ السل)، *Treponema palladium* (1.14Mbp؛ الزهري) و*Chlamydomonas trachomatise* (1.04Mbp؛ إصابات العين). ويفترض أن مسارات الأيض أو انتقال الإشارات (signal transduction) المتخصصة بالكائن الممرض أن تُحل من المعلومات الجينومية، ما يقود إلى توفر أهداف محددة يمكن توظيفها في تطوير الأدوية. فعلى سبيل المثال، يحاول الخبراء تعريف البنى الأساسية الموجهة ضد أيض أيون النيكل (Ni^{2+})، الذي هو صفة خاصة بالـ *Helicobacter pylori* لأن هذا الكائن المجهري يدرأ (buffer) العصارة الهضمية العالية الحموضة بواسطة أنزيم اليورياز (urease) المعتمد على النيكل.

التصنيع الحيوي والتصنيع التطفيري للمركب السالف		
نوع المضاد الحيوي	المنتج	تلقيم الوسط بالمركب السالف
البنيسيلينات	*Penicillium chrysogenum*	العديد من الأحماض الالكربونية المفترحة (aliphatic)، الحلقية المفتوحة والعطرية
السيفاوسبورينات	*Acremonium chrysogenum*	S-كاربوكسي ميثيل –L– سيستين (S-carboxmethyl-L-cysteine)
البليومايسينات (bleomycins)	أنواع الـ *Streptomyces*	أمينات معدلة
الباسيتراسيات (bacitracins)	*Bacillus licheniformis*	أحماض أمينية-D خاصة (D-allo amine acids)
الستريبتومايسين	*Streptomycs griseus*	2– دي أوكسي ستريبتيدين (2-deoxy streptidine)



اختصاصات

الفيتامينات (Vitamins)

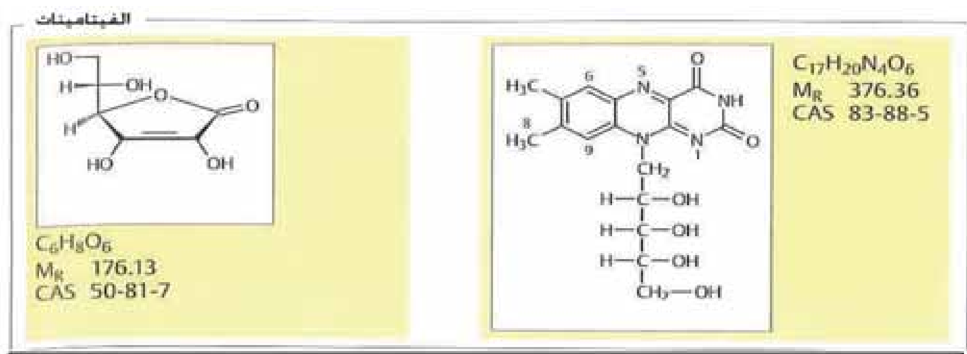
عموميات (General). تستعمل الفيتامينات كإضافات في المستحضرات الطبية وعلف الحيوان. يبلغ حجم سوقها حوالى 3 بليون دولار أمريكي (عالمياً). أما تصنيعها فيتم معظمه عن طريق التصنيع الكيميائي أو الاستخلاص من مواد نباتية، كما استُخدمت عمليات التقانة الحيوية في تصنيع الفيتامينات B2 وB12 وC.

الفيتامين B2 (الرايبوفلافين): إن مشتقات الرايبوفلافين (riboflavin) FAD وFMN هي عوامل مساعدة (co-factors) لكثير من أنزيمات الخزلدة (redox). يوجد الرايبوفلافين الحر فقط في الحليب. ويتطور لدى الحيوانات التي تتغذى على غذاء فقير بالرايبوفلافين فيحدث التهابات جلدية واختلالاً في النمو وأضراراً في العيون. إن التصنيع الحيوي للرايبوفلافين يجري من خلال مسار معقد بدءاً بالغوانوزين ثلاثي الفوسفات (guanosine triphosphate). وهو يمكن أن يُنتج بالتصنيع الكيميائي، أو التخمير أو التركيب الكيميائي أنزيمي (chemoenzymatic synthesis)؛ في حين أن 70٪ تقريباً من الإنتاج العالمي(حوالى 4000 طن) يتم عن طريق التخمير. في هذه العملية التي تَستخدم طافرات (mutants) عالية الأداء من الفطر *Ashbya gossypii* في مخمر الدفعة (batch fermenter) (مصدر الكربون: زيوت نباتية، مصدر النتروجين: دقيق الصويا) يصل العطاء من الرايبوفلافين إلى $15gL^{-1}$ في 72 ساعة. وتضم عملية الاسترجاع فصل الخلايا وتطبيق إجراءات الكروماتوغرافيا (chromatography). أما في العملية الكيميائية الأنزيمية التي لم تستعمل على نطاقٍ تجاري حتى الآن، فإنه يجري تصنيع حلقة alloxazine وتحضير الـ D-ribose من الـ D-Glucose بطافرات من *Bacillus pumilus* ليتم بربطهما كيميائياً.

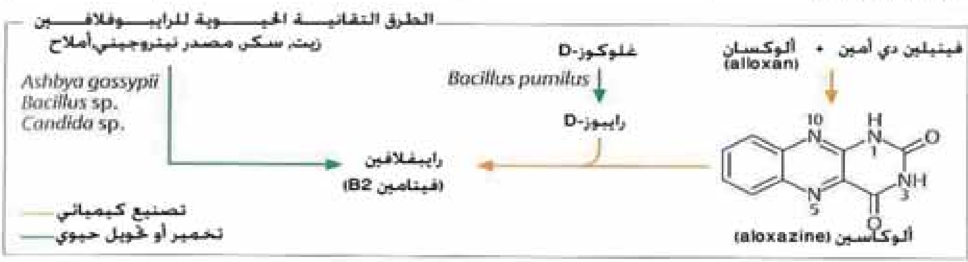
فيتامين B12 (cyanocobalamine): تنجم الحاجة إلى فيتامين B12 بكونه عاملاً مساعداً (co-factor) في عدة تفاعلات من إضافة الميثيل (methylation) والمصاوغة (isomerization). يقود عوز فيتامين B12 إلى حالات فقر الدم خاصةً الأنيميا المميتة (pernicious animia). وعلى الرغم من استعماله في المستحضرات الطبية (بشكل رئيسي لحماية الكبد) وفي الغذاء، إلا أن نصف الإنتاج العالمي منه البالغ حوالى 20 طناً يضاف إلى الأعلاف الحيوانية. يبدأ التصنيع الحيوي للفيتامين B12 من الساكسينويل كو (succinoyl CoA) A والغلايسين (glycine)، اللذين يتكثفان إلى 5-amino -oxo valeric acid (δ-amino levulinic acid)، وفي 30 خطوة إضافية التي يمكن أن تختلف باختلاف الكائن الحي يتشكل 5'-deoxyadenosyl cobalamin؛ في حين تُستخدم عملية التخمير التي تعتمد على *Propionibacterium shermanii* أو *Pseudomonas denitrificans* لصناعة فيتامين B12. في هذه العملية يُستَخدم وسط يحتوي على المولاس (molasses) أو الدكسترين (dextrin) كمصدر للكربون بالإضافة إلى الأمونيا وأملاح الكوبالت (cobalt). وباستعمال 5، 6 dimethylbenzimidazol كمركب أصل، يمكن أن يصل العطاء إلى $150mgL^{-1}$ بعد 120 ساعة. لقد تم تنسيل (كلونة) جميع جينات مسار تصنيع فيتامين B12 في *Propionibacterium shermanii*، كما جرت أمثلة سلالات إنتاج جديدة من خلال الهندسة الأيضية (metabolic engineering).

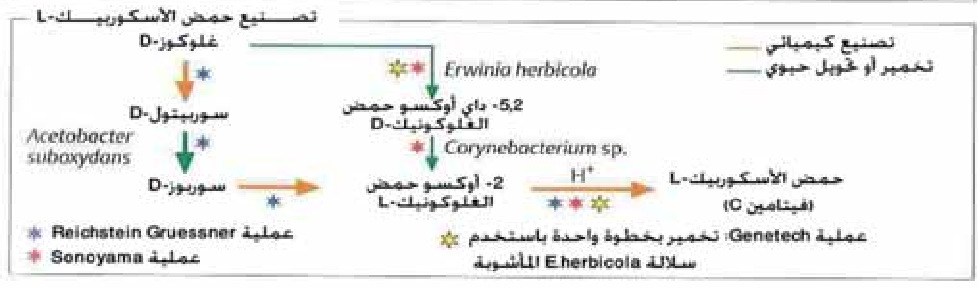
فيتامين C (L-ascorbic acid): غالباً ما يدعى حمض الأسكوربيك (ascorbic acid) بـ «عامل الاختزال الفيزيولوجي» وهو يساهم في الإزالة الاختزالية لفصائل الأكسيجين الفعالة، مثل جذور الأكسيجين (oxygen radicals)، كما يشارك في عدة تفاعلات أنزيمية كعامل مساعد. إن التعرض إلى نقص في الفيتامين C ينتج منه تلف للجلد والأوعية الدموية (كرض الأسقربوط (scurvy)). ويباع هذا الفيتامين كمستحضر فيتاميني، ويضاف أيضاً إلى عدد كبير من الأغذية والمشروبات كفيتامين وكمضاد للأكسدة (antioxidant). يصل إنتاجه السنوي إلى 80000 طن (عالمياً) حيث يعتمد الإنتاج على التصنيع الكيميائي الأنزيمي بدءاً من D ـ غلوكوز (D-glucose). يمثل طريق ريخشتين غروسنر (Reichstein-Gruessner way) أو التعديلات المنفَّذة عليه أفضل الطرق لتصنيعه، الذي يضم اختزال الغلوكوز كيميائياً إلى سوربيتول (sorbitol) ثم أكسدة طرفية فرعية (subterminal oxidation) لهذا المركب الأخير بواسطة *Acetobacter suboxydans* إلى L ـ سوربوز (L-sorbos). يبلغ العطاء الإجمالي لهذه العملية حوالى 66٪، وهي تجري (عملية الأكسدة) بصورة مستمرة أو على دفعات، كما تتطلب خلايا مثبتة (immobilized cells) وتهوئة قوية، ليكون العطاء كمّياً بعد 24 ساعة. أما في العملية المنافسة Sonoyama، فيؤكسد الـ D ـ غلوكوز بواسطة النوع *Erwinia* إلى 2، 5-dioxo-D-gluconic acid (94٪ من العطاء بعد 26 ساعة) الذي يُختزل بواسطة أنواع *Corynebacterium sp.* 2-oxo-D-gluonic acid (92٪ من العطاء بعد 66 ساعة) الذي يعاد ترتيبه إلى L-ascorbic acid عند إضافة الحمض. لقد نُسِّل الأنزيمان المسؤولان عن هاتين الخطوتين وعُبِّر عنهما في كائن حي واحد (*Erwinia herbicola*). وتجري المحاولة من خلال عملية Genentech لإنتاج L-ascorbic من D-glucose في خطوة تخميرية واحدة باستخدام كائن حي مأشوب، التي يتبعها إعادة تنظيم محفزة بالحمض. ولسوء الحظ، إن القدرة على تحمل الغلوكوز لدى سلالات الإنتاج هذه لا زالت منخفضة ما ينتج منها عطاءات زمكانية (space-time yield) غير مُرضية.

الفيتامينات



عمليات التصنيع وحجم السوق			
الفيتامين	**الكمية (طن) ~ 2000**	**عملية التصنيع**	**التطبيقات**
A بيتا-كاروتين (β-carotene)	30	تصنيع كيميائي	تغذية الحيوانات، ملوّن
B_1 ثيامين (thyamine)	3000	تصنيع كيميائي	صحة
B_2 رايبوفلافين (riboflavin)	4000	تخمير (30%)، تصنيع أنزيمي كيميائي (50%) تصنيع كيميائي (20%)	صحة، تغذية الحيوانات
B_6 بايريدوكسين (pyridoxine)	3000	تصنيع كيميائي	صحة، تغذية الحيوانات
B_{12} سيانوكبالامين (cyanocabalamine)	20	تخمير	صحة، تغذية الحيوانات
C حمض الأسكوربيك (ascorbic acid)	8000	تصنيع تخميري كيميائي	صحة، إضافة غذائية، تغذية الحيوانات
D_2 كالسيفيرول (calciferol)	40000	تصنيع كيميائي ضوئي من الأورغيستيرول بائي ضوئي من الأيرغوستيرول (ergosterol)	صحة
E ألفا-توكوفيرول (α-tocopherol)		إستخلاص من زيوت نباتية، الطحالب	صحة





• النيوكليوزيدات والنيوكليوتيدات

(Neucleosides and nucleotides)

عموميات (General). اكتشفت النيوكليوتايدات منذ ما يقارب 50 عاماً في اليابان كمكوّنات معززة للطعم في الفطر والسمك المجفف. فحتى لو أضيفت كميات ضئيلة جداً من هذه المركبات (0,0005 ـ 0,001٪) إلى الشوربات أو النقانق، فإن طعمها يتعزز بشكلٍ هام والنكهة غير المرغوبة مثل الطعم المعدني للغذاء المعلّب يتم كبحها. ويزيد من هذا التأثير إضافة صوديوم الغلوتامات L- (Na-L-glutamate)، كما يبدي كلٌّ من الـ IMP (Inosine-5´-monophosphate)، والـ GMP (guanosines-5´-monophosphate) والـ XMP (xanthosine-5´-monophosphate) أقوى فعالية، بينما مصاوغاتها المفسفرة على الموقع 2´ أو 3´، ونيوكليوتيدات البايريميدين (pyrimidine nucleotides) والنيوكليوزيدات (nucleosides) لا تمتلك أي تأثير. إضافةً إلى ذلك فإن الـ AMP، - 5´(adenosine-monophosphate) والـ دي أوكسي IMP (deoxy IMP) والـ دي أوكسي GMP (deoxy GMP) فهما أقل فعالية من IMP- 5´ أو GMP- 5´. لقد أنتج الـ IMP- 5´ والـ GMP- 5´ منذ عام 1961 على مستوى صناعي ووصل إنتاجه إلى 1000 طن في السنة، يتمركز منتجوه بشكلٍ أساسي في آسيا.

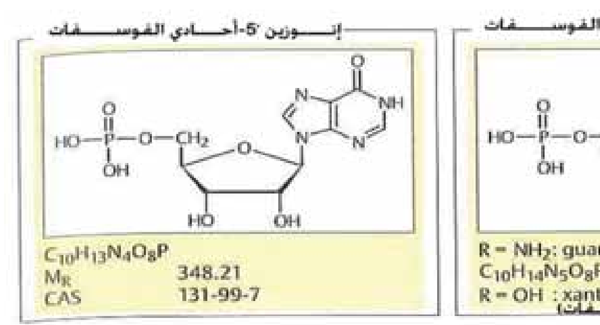
عملية التصنيع (Idustrial process): تستعمل في اليابان أربع عمليات تصنيع: (1) التحليل الأنزيمي (enzymatic hydrolysis) للـ RNA، و(2) دمج عملية إنتاج الإينوزين (inosine) أو الغوانوزين (guanosine) التخميرية مع عمليات فسفرتها (phosphorelation) الكيميائية، و(3) الإنتاج المباشر للـ IMP- 5´ بالتخمير، و(4) الإنتاج المباشر لـ XMP- 5´ بالتخمير، وتحويلها أنزيمياً إلى GMP- 5´.

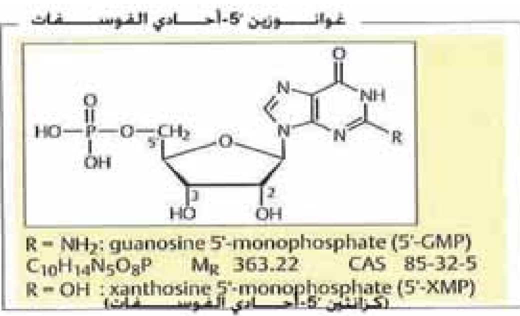
التحليل الأنزيمي للـ RNA (Enzimatic hydrolysis of RNA): تبدي الخمائر النسبة الأكثر تفضيلاً للـ RNA/DNA، لذا يفضل استعمالها لإنتاج الـ RNA. فإذا نُمِّيَت *Candida utilis* على المولاس (molasses) أو عجينة الورق (pulp)، باستعمال أوساط ذات نسبة C/N منخفضة، فإن الخلايا ستحتوي على 10 ـ 15٪ RNA (وزن جاف) في الطور التصاعدي (exponential) المبكر. يمكن زيادة هذه الكمية بإضافة الفوسفات وأيونات الزنك (Zn^{2+}). تُنَفذ عملية التخمير الهوائية (aerobic fermentation) بصورةٍ مستمرة على مستوى ضخم باستعمال مفاعلات حيوية ذات مصاعد هوائية (airlift bioreactors). ثم بعد إزالة الكتلة الخلوية، يجري استخلاص الـ RNA بمحلول قلوي ساخن من كلوريد الصوديوم (5 ـ 20٪ NaCl، 100°C، 8 ساعة) ثم يُرسَّب بحمض الهيدروكلوريك (HCl) أو الإيثانول (ethanol). ومن أجل التحليل الأنزيمي للـ RNA فإن مستحضرات من نيوكلياز P_1 (nuclease P_1) المأخوذ من *Penicillium citrinum* تُستخدم، لعدم احتوائها على أنزيمات تفكيك النيوكليوتيدات (nucleotidases) أوالفوسفات (phosphatases). ويتم العزل النهائي للـ IMP- 5´ والـ GMP- 5´ بالادمصاص على الفحم المفعل، لتجزَّأ بعد ذلك بكروماتوغرافيا التبادل الأيوني (ion exchange chromatography) والبلورة (crystallization).

تخميرالـ IMP- 5´: يعتمد البروتوكول التقليدي لتخمير الـ 5'-IMP على تشكيل الإينوزين (inosine) بالتخمير بواسطة أنواع بكتيريا *Baillus* وكائنات مجهرية أخرى موجبة الغرام. تقوم هذه الكائنات بإفراز الإينوسين إلى الوسط حيث يمكن ترسيبه عند رقم هيدروجيني (pH) 11. في عملية التخمير، ولدى استخدام طافرات مخلطة التغذية من الأدينين (adenine-auxotrophic mutants) ذات خصائص نقل (للمركبات المفرزة) محسنة من خلال الهندسة الوراثية، فإن ذلك يمكن أن يُفضي إلى عطاء يبلغ $35gL^{-1}$. بعدها يتم تحويل الإينوسين المعاد تبلوره (recrystallized) إلى IMP- 5´ بالفوسفات ثلاثي الكلوريد (PCl_3) الموجود في مذيبات ثلاثي ألكيل الفوسفات. أما العملية الأخرى فتتمثل بالتشكيل المباشر للـ IMP- 5´ كمنتج خارج خلوي (extracellular product)، باستعمال طافرات موقِفة (مُعَطِّلة) من *Brevibacterium (Corynebacterium) ammoniagenes*. فالطافرت العالية الكفاءة هذه المستخدمة في الإنتاج لا يتم كبحها مجدداً بوجود النيوكليوسيدات الأخرى؛ وهي لا تُحطِّم الـ IMP- 5´ وغير حساسة للـ Mn^{2+} في الوسط؛ كما أن غشاءها البلازمي يبدي قدرة عالية على إفراز الـ - 5´ IMP. إضافةً إلى ذلك، إذا تم تنسيل (كلونة) عدة نسخ من الأنزيم الهام PRPP amidotransferase في كائن حي كهذا فإنه يمكن أن يرتفع العطاء أكثر، وربما يصل إلى $30gL^{-1}$.

إنتاج GMP- 5´: العمليات المفضلة هي: 1) إنتاج الجوانوزين (guanosine) بالتخمير، يليه عملية فسفرة كيميائية، و2) إنتاج XMP بالتخمير وتحويله أنزيمياً إلى GMP. وقد تمّت الإفادة عن تشكيل الـ GMP من -5 aminoimidazole carboxamide-1-riboside (AICA-riboside). من خلال سلالات مخلطة التغذية من البيورين (purine auxotroph) من *Bacillus megaterium*، المتبوعة بالتحويل الكيميائي إلى GMP- 5´، غير أنها لا تستعمل على نطاق صناعي حالياً.

النيوكليتيدات الأخرى: إن نيوكليوتيدات (nucleotides) مثل ATP، cAMP، NAD/NADH، NADP/NADPH، FAD، الأنزيم المساعد A (CoA) والغلايكوزيدات النيوكلوتيدية جميعها مواد كيميائية حيوية هامة، تم استخدامها في عمليات تحويل حيوية مميزة. وهي تحضر إما باستعمال طافرات موقفة (معطِّلة) أو عن طريق عمليات أنزيمية بدءاً من مركبات سالفة كيميائية. فعلى سبيل المثال، يمكن أن تحضر كل من NAD^+ والأنزيم المساعد A بالتخمير باستعمال طافرات موقفة (معطِّلة) من *Brevibacterium (Corynebacterium) ammoniagenes* بعطاءٍ يبلغ حوالى $2gL^{-1}$.





التصنيع وحجم السوق

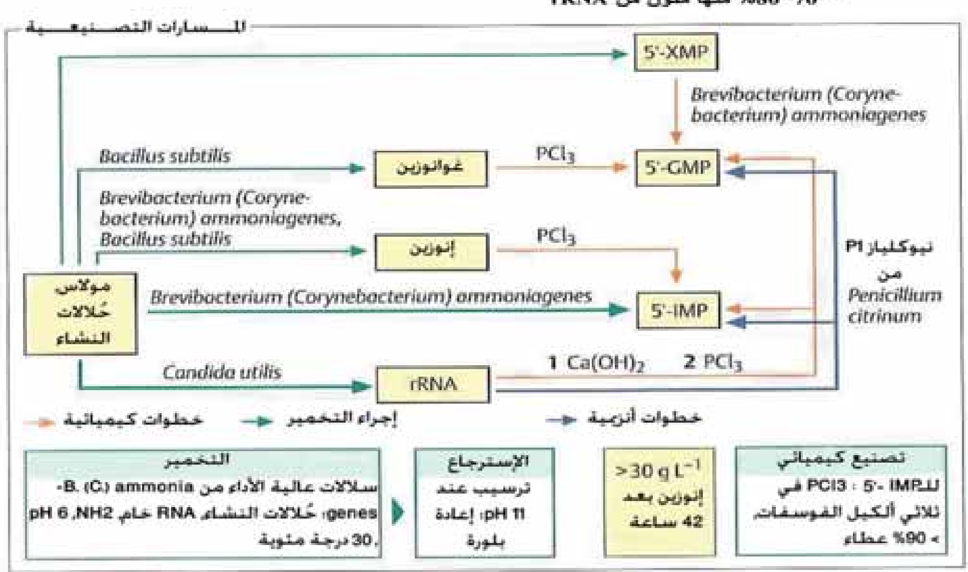
النيوكليوزايد	حجم السوق (طن)	عملية التصنيع	التطبيقات
5'-IMP 5'-GMP	2000 1000	تحليل أنزيمي لـRNA الخميرة تخمير الإنوزين/ الغوانوزين وفسفرة كيميائية أو تخمير مباشر للـ-'5 IMP	معزز طعم معزز طعم
إنوزين	25	تخمير	العلاج الطبي
حمض الأوروتيك	20	تخمير	أمراض الكبد
الأدينين، الأدينوزين، ATP	22	تخمير ، تصنيع كيميائي	العلاج الطبي

محتوى الكائنات المجهرية من DNA/RNA

	البكتريا	الخميرة	الفطر
DNA*	0.37−45	0.03−0.52	0.15−3.3
RNA**	5−25	25−15	0.1−28

*النسبة المئوية من الوزن الجاف للخلية

**70−80% منها مكون من rRNA



• مخفضات التوتر السطحي ومستحضرات التجميل الحيوية (Biosurfactants and biocosmetics)

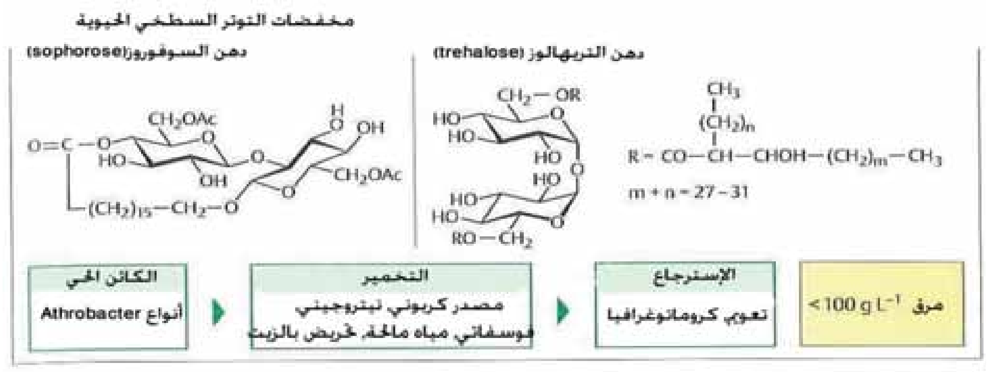
عموميات (General). هناك بعض الكائنات المجهرية، إذا تعرضت إلى الألكانات (alkanes) أو الزيوت النباتية أو حتى السكريات فإنها تكوّن عوامل فعالة على السطح (surface-active)، غالباً ما تُسمى «مخفضات التوتر السطحي الحيوية» («biosurfactants»). ومقارنة بمخفضات التوتر السطحي المصنعة، التي تنتج بكميات تصل إلى عدة ملايين من الأطنان، فإن مخفضات التوتر السطحي الحيوية هي أكثر تكلفة بكثير، وبالتالي فهي تُستخدم في حيز محدود من الاختصاصات. ونظراً إلى قابليتها الجيدة للتفكيك الحيوي (biodegradability)، فيجري دراستها كوسائل «صديقة» للبيئة لتنظيف المياه الملوثة بالنفط والتربة والشواطئ قليلة العمق. كما تحتوي بعض مراهم التجميل على مخفضات توتر سطحي حيوية أيضاً، تدعى أحياناً بـ «مستحضرات التجميل الحيوية» («biocosmatics»). إلا أن هذا الاصطلاح في السوق غير معرَّف جيداً، وغالباً ما يشمل أنواعاً مختلفة من مستحضرات التجميل التي أضيف إليها منتجات طبيعية. ومن أمثلة المواد التي تنتج بالتقانة الحيوية والمُتضمَّنة بمستحضرات التجميل الحيوية هي الشيكونين (shikonin) وهو صبغة حمراء ذات مصدر نباتي تستعمل في أحمر الشفاه، وحمض الهيالورونيك (hyaluronic acide) وهو عديد السكاريد ومستبقٍ جيد للماء بحيث يمكن أن تنتجه الكائنات المجهرية.

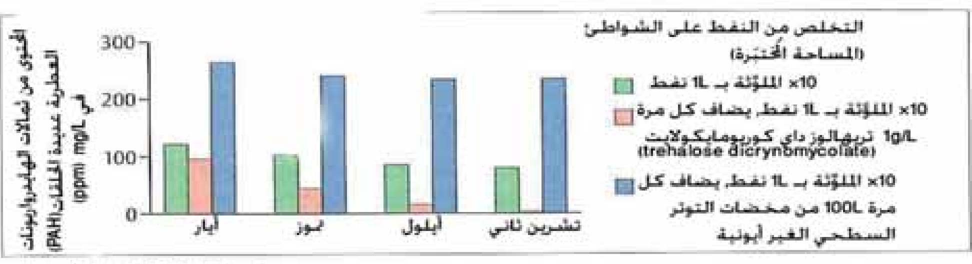
مخفضات التوتر السطحي الحيوية (Biosurfactants): تشكلها أنواع من البكتيريا والخمائر حينما تنمو على الألكانات (alkanes) أو الزيوت النباتية. تشمل الأشكال المدروسة جيداً منها، دهون الرامنوز (rhamnose) والتريهالوز (trehalose) البكتيرية، ومادة مخفض التوتر السطحي (surfactin) الببتيدية الدهنية، ومادة الاستحلاب عديدة السكاريدات المتباينة (heteropolysaccharide emulsan). إن دهون السوفوروز (sophorose) هي أمثلة معروفة على مخفضات التوتر السطحي التي تنتجها الخميرة. تقوم بتكوينها *Torulopsis bombicola* بعطاءٍ يفوق الـ $400gL^{-1}$ في حالة تنميتها على شحوم ثلاثية (triglycerides). بعد إنجاز عملية التخمير، يمكن فصل مزيج الدهون السكرية (hydroxyl acid glycolipids) واللاكتون (lactones) من المرق بالتعويم (flotation) أو الاستخلاص بالمذيب. تميل المنتجات المنقاة إلى تشكيل مُذَيّلات (micelles) ذات CMC (التركيز الحرج للمُذَيّلة ـ critical micelle concentration) ـ قيمة تشير إلى فعالية مخفض التوتر السطحي) تقع في المجال النموذجي لمخفضات التوتر السطحي المصنعة غير الأيونية. إن دهن الـ sophorose تتم إضافته بكميات قليلة إلى مراهم حماية الجلد التجميلية المباعة في اليابان. والـ rhamnolipids التي تنتجها سلالات من Pseudomonas يمكن أن تحضر بعطاء يبلغ حوالى $100gL^{-1}$، كما أنها تُختبر كإضافات إلى المنظفات المنزلية. لقد أعطت التجارب التي تعمل على اختبار دور مخفضات التوتر السطحي على استرجاع النفط الثالثي (tertiary oils recovery) (إنتاج الدهون السكرية في الموقع عند ثقب الحفر) وفي تنظيف التلوث النفطي للشواطئ قليلة العمق، نتائج جيدة من الناحية التقنية، وليس من الناحية الاقتصادية. ومن ضمن الكائنات الأخرى المدروسة الفطر *Ustilago maydis*، الذي ينتِج دهون الـ cellobiose، و*Rhodococcus erythropolis*، الذي يُفرز التريهالوز رباعي الإستر (trehalose tetraesters). واعتماداً على نوع المركب الأولي (substrate) الكاره للماء (hydrophobic)، يمكن التحكم بطول سلسلة الدهون السكرية في بعض الحالات. إن مادة الاستحلاب هي عديدة السكاريد المتباين (عديدات سكاريد دهنية (lipopolysaccharide)) تُصنَّع بواسطة *Acentobacter calcoaceticus* بوجود شحوم ثلاثية. وهي من الممكن أن تُنتَج بالتخمير حيث يتم عزلها من مرق الزرعة عن طريق الاستخلاص بالمذيبات. إذا أضيفت هذه المادة إلى معلق من الزيت الموجود في الماء، فإنها تعمل كمستحلِب للزيت في الماء (oil-in-water emulsifier)، وبالتالي تخفض من لزوجة الزيت إلى حد كبير. يمكن أن تستعمل هذه المادة بكميات قليلة لتحسين جريان النفط في الأنابيب ولتنظيف شاحنات النفط وناقلاته. إن *Bacillus subtilis* هي بكتيريا تقوم بإنتاج مادة تخفيض التوتر السطحي السباعية الببتيد والمضاف إليها مجموعة الأسيل (acylated heptapeptide surfactin)، وذلك لدى تنميتها على مركبات أولية كارهة للماء. تبدي هذه المادة فعالية عالية في تخفيض التوتر السطحي (CMC عالٍ) لكنها أيضاً تسبّب تسمماً في الدم (hematotoxic) للثديات والكائنات المائية. أما عطاءات إنتاجها فيمكن أن ترتفع في ظروف التخمير المثالية إلى $110mgL^{-1}$، لكنها تبقى أقل من عطاء الـ sophorolipid.

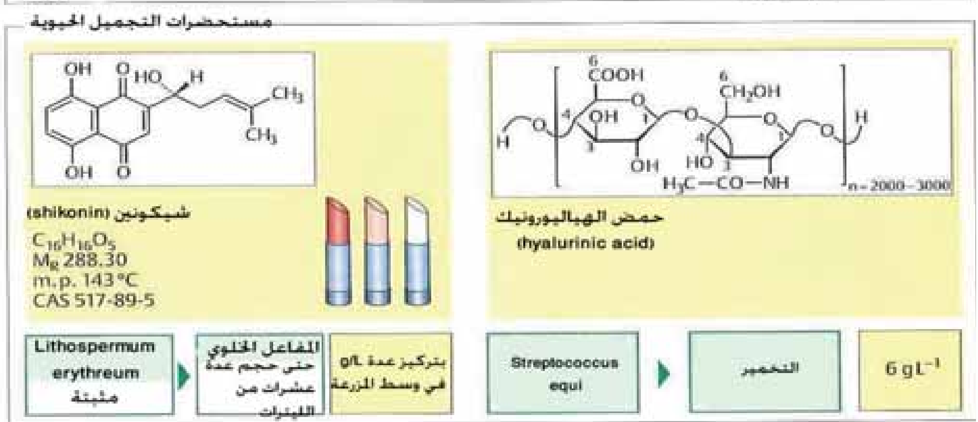
شيكونين (Shikonin): وهو مشتق للـ naphtochinone الذي تُنتِجه أزهار *Lithosporum erythreum* من نباتات لسان الثور. يمتلك الشيكونين قدرة على مداواة الجروح وفعالية مضادة للسرطان، كما يستعمل كصبغة في تشكيلة من أحمر الشفاه المباعة في اليابان. يتحقق انتاجه صناعياً عن طريق مزارع الأنسجة النباتية، حيث يمكن تعديل لون الصبغة بإضافة معادن انتقالية (transition metals).

حمض الهيالورونيك (Hyaluronic acid): هو glycosyl amino glucan ذو M_R $1\text{-}4x10^6$ Da، وأحد مكونات النسيج الضام (connective tissue)، كما يوجد أيضاً في سائل الزُلال. عادة ما يتم عزله من عرف الديك أو الحبل السري، لكن يمكن أن ينتج، ولو بأقل M_R، بالتخمير عن طريق استخدام *Streptococcus equi* أو *S. zooepidemicus* مع عطاء يبلغ حوالى $6gL^{-1}$ في 20 ساعة. ونظراً إلى ارتفاع قدرته على الارتباط بالماء واستبقائه، فإنه يستعمل في كلٍّ من مواد التجميل والزرع الجراحي.

مخفضات التوتر السطحي الحيوية		
	الكائن الحي	العناصر البنيوية
دهن السوفوروس (sophorose lipid)	*Torulopsis bmbicola*	سوفوروز (sophorose)، أحماض دهنية هايدروكسية
دهون السيلوبيوز (cellobiose lipids)	*Ustilago maydis*	سيلوبيوز ، أحماض دهنية
دهون الرامنوز (rhamnose lipids)	*Pseudomonas aeuginosa*	رامنوز ، بتا-هايدركسي حمض الديكانويك-β) hydroxydecanoic acid)
دهو التريهالوز (trehalose lipids)	Corynebacteria، Arythrobacter	تريهالوز ، إسترات شمع طويلة السلسلة
كورينمايكولايت (carynomycolates)	Corynebacteria، Arythrobacter	إسترات حمض المايكوليك للساكاريدات الأحادية، الثنائية و الثلاثية
إملسان (emulsan)	*Acinetobacter calcoaceticus*	عديدات الساكاريد المتغايرة والمتعددة الشحنة السلبية الوزن الجزيئي ~ 10^6 Da
سورفاكتين (surfactin)	*Bacillus subtilis*	ببتيد سباعي مضاف إليه مجموعة الأسيل (acylated heptapeptide)







• عديدات السكاريد الميكروبية

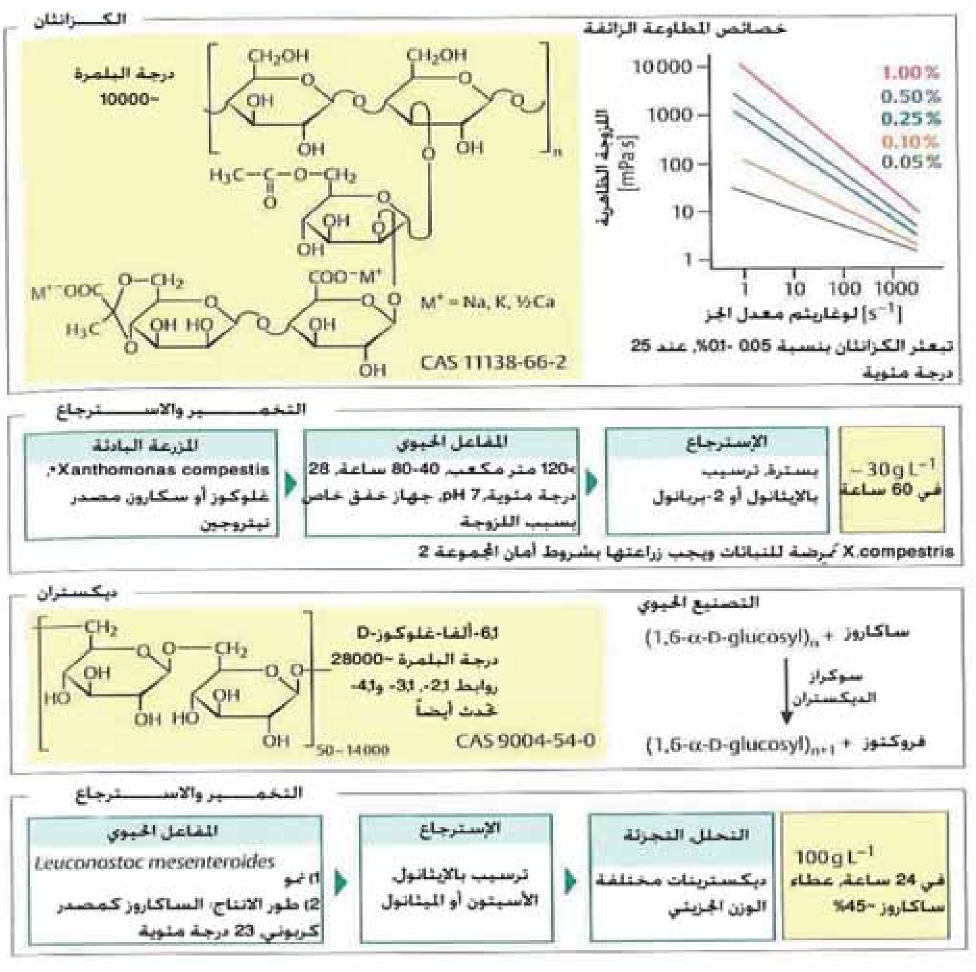
(Microbial polysaccharides)

عموميات (General). تستعمل عدة مركبات من عديدات السكاريد مثل النشاء، السيليلوز (cellulose)، الصمغ العربي، البكتين (pectins)، الألجينات (algenates) والآغار (agar) في تصنيع الغذاء كمثخنات ومثبتات. كما يستعمل الزانثان (xanthan) في استكشاف النفط. على الرغم من أن معظم عديدات السكاريد تعزل من النباتات أو الطحالب البحرية (مصادر متجددة)، فإن بعضها يصنع كمنتجات خارج خلوية (extracellular) للكائنات المجهرية عن طريق التخمير. وحيث إن اقتصاديات عمليات التخمير تقارن سلبياً مع تحضير عديدات السكاريد النباتية أو البحرية، فإن استعمالها يبقى محدوداً في مجالات مختصة. إن أكثر عديدات السكاريد الميكروبية أهمية هي الزانثان والدكستران (dextran)؛ وحمض الهيالورونيك (hyaluronic acid) الذي تم تناوله أعلاه.

الكزانثان (Xanthan): هو عديد سكاريدات متباينة حمضي (acid heteropolysaccharide)، تشكله بدائيات النواة (prokaryots) الممرضة للنباتات *Xanthomonas campestris*. يتألف الزانثان من 5 ثمالات هكسوز (hexose) متكررة، وهو ذو وزن جزيئي بحدود $1.5\text{-}2x10^6$ Da. يمكن أن يتغير عدد ثمالات البيروفات (pyruvate) في هذا المركب، إلا أن ذلك لا يؤثر كثيراً في لزوجة البولمير الحيوي. كما أن لزوجته غير حساسة لوجود مركبات التحليل الكهربائي (electrolytes)، ويُظهر البوليمير الحيوي منه خصائص بلاستيكية زائفة (pseudoplastic)(تتناقص لزوجة محلول الزانثان عكسياً بزيادة الجز)، وبالتالي فهو مناسب جداً للاستعمال في العمليات الصناعية. إن استعماله الأكثر أهمية هو كمثخن للطعام المُحَضر (مثل تتبيل السلطة). لقد تمّت دراسة استعمال الزانثان في الاسترجاع الثالثي للنفط، وذلك لتطويف البوليمير الناتج من تشكيل التربة المالحة، بشكلٍ واسع، إلا أن الانخفاض في أسعار النفط وتحسن تقانة الاسترجاع جعلته غير ناجح تجارياً. كما ويستعمل الزانثان في «طين» الحفر لاكتشاف النفط وتطويره. تُنَفَّذ عملية التخمير لإنتاج الزانثان بنمط الدفعة الواحدة (batch mode) (المصدر الكربوني: الغلوكوز أو السكروز (sucrose)؛ المصدر النتروجيني: الببتون (peptone)، أو أمونيوم النترات (ammonium nitrate) أو اليوريا (urea)) ولدى التعبير عن المشغل الحيوي - أوبرون - اللاكتوز (lac operon) للبكتيريا *E.coli* في *X.campestris*، أدى ذلك إلى وجود سلالات قادرة على تشكيل الزانثان من مصل اللبن، وهو منتج فضالي. إلا أن هذه العملية لا تزال غير منافسة تجارياً. يجري الكشف عن تشكيل الزانثان خلال عملية التخمير بالارتفاع الحاد للزوجة إلى 10000cP. من المهم جداً توفر شكل خاص لأداة التحريك إذا ما كان مطلوباً توفر مقدار كاف من O_2 في هذا الوسط اللزج لتحقيق عطاءات مرتفعة. يتم عزل المنتج من المرق عادةً بالترسيب بواسطة محلول 2-propanol، حيث ينتج حالياً حوالى 30000 طن/ سنة من الزانثان.

الدكستران (Dextran): يستعمل طبياً كموَسِّع للبلازما، ونظراً إلى التحديد الدقيق لحجم الثقوب في كلا الشكلين الأصلي وبعد الاشتقاقات الكيميائية، فهو يُستخدم أيضاً في تنقية البروتينات. إن الديكسترانات هي غلوكانات (glucans) تُصنع من الغلوكوز ذي الوضعية D- (D-glucose) عبر روابط غلوكوزايدية لـ α-1,6-، (6 glycosidic linkage) في أغلب الأحيان. تصل كتلها الجزيئية إلى $5x10^7$ Da وهي تُنتج كمنتجات خارج خلوية (extracellular) بواسطة عدة كائنات مجهرية مثل *Streptococcus mutans* في التجويف الفموي (oral cavity) لدى الإنسان مسببة تشكل البلاك على الأسنان. ولتصنيع الدكستران تقنياً تُوظف البكتيريا *Leuconostoc mesenteriodes* عادة التي تنتج $500gL^{-1}$ في 24 ساعة باستعمال السكروز كمادة أولية (substrate)، بعد ذلك يمكن ترسيبه من المرق بإضافة الإيثانول. وفي حالة تحلله (hydrolysis) جزئياً بإضافة الحمض، فإنه يتم عزل دكسترانات ذات كتل جزيئية مختلفة بالترسيب المجزأ (fractionated hydrolysis)، بحيث تستعمل الدكسترانات ذات M_R 75000 Da كموسعات بلازما وتلك ذات وزن جزئي M_R مقداره 40000Da كمضادات تجلط في الجراحة.

عديدات السكاريد الميكروبية الأخرى: تشكل *Pseudomonas aeruginosa* و*Azotobacter vinelandii* الألجينات الميكروبية التي يشبه تركيبها المنتجات الطحالبية. وتشكل بعض الفطريات السكليروغلوكان (scleroglucan) وهو عديد السكاريد مكوَّن من ثمالات غلوكوز مرتبطة برابطة β-1,3 تحتوي على وحدة غلوكوز طرفية مرتبطة برابطة β-1,6. وعلى نحوٍ شبيه بالجيلان (gallan) المنتج من قبل *Sphingomonas elodea*، فإن الـ scleroglucan يبدي خصائص مُطاوَعة زائفة شبيهة بالزانثان (xanthan) حيث يستعمل بكميات قليلة كعامل هلمنة (gelling agent) في المنتجات الغذائية. أما البولان (pullulan) الذي هو غلوكان مرتبط برابطة لِ α-1,4، مع احتوائه على 10٪ رابطة غلايكوزايدية لِ α-1,6، (6- glycosidic bonds) فيُصنّع بواسطة أنواع مختلفة من البكتيريا. وهو يمكن أن يصنع بشكل أغشية (films) غير نفوذة للأكسيجين؛ حيث أجريت الأبحاث عليه من أجل حماية الأغذية والمواد الأخرى الحساسة للأكسيجين. لكن التكلفة العالية لإنتاج هذه البوليميرات جميعها هي التي منعت استعمالها على مستوى واسع حتى الآن.



بيانات السوق والتطبيقات

عديدات الساكاريد	الإنتاج (طن)	السعر (دولار أمريكي / $/kg)	الكائن المجهري	التطبيقات
الزانثان	~30000	14–10	*Xanthomonas capestris*	إضافة غذائية، استكشاف النفط
الديكستران ومشتقاته	2000 600	390–35 2800–400	*Leuconostoc mesenteroides*	مُمَدِّد بلازماء، إضافة غذائية، كيماويات حيوية
حمض الهياليورونيك (hyaluronic acid)	500	100000–2000	*Strepococcus equi*	العمليات الجراحية، مواد التجميل

عديدات سكاريد ميكروبية أخرى تمتلك بعض الأهمية الاقتصادية:

الألجينات (algenate) (*Azotobacter*)، كوردلان (curdlan) (*Agrobacterium*)، *Rhizobium* جيلان (gellan) (*Sphingomonas*)، بولولان (pululan) (*Pullularia*)، سيلولوز (*Acetobacter*)، بيتا–غلوكان (فطري الأصل)

• المواد الحيوية (Biomaterials)

عموميات (General). يمكن تصنيع البوليميرات القابلة للتفكك الحيوي (biodegradable) من أحماض الهيدروكسي كربون (hydroxycarbonic acids) الطبيعة المنعدمة التناظر المرآتي (chiral). تبدي عديدات الأميد (polyamides) الطبيعية مثل الحرير (الفبروين (fibroin)، خيط العنكبوت) أو بروتينات المحار خصائص غير عادية وإمكانية تقنية هامة وهي موضوع مشاريع الأبحاث الأساسية، حيث تجري الآن دراسة مواد الـ bacteriorhodopsin المتنوعة التي تشكلها *Halobacterium halobium* كمواد تخزين بصرية.

البوليميرات القابلة للتفكك الحيوي (Biodegradable polymers): تنتج البولي أكتيدات (polylactides) (NaturWorks™) من حمض اللبن ذي الوضعية -L- L (lacticacid) بمستوى يتعدى الـ 10000 طن، وسيبدأ قريباً تصنيع البوليميرات المشتركة (copolymers) من الـ 1 propane، 3-diol والـ (Sorona™) terephtalic acid. هناك الكثير من الكائنات المجهرية، مثل، *Ralstonia europhia* التي تقوم بتخزين حتى 90٪ من كتلها الجافة الخلوية على شكل -poly [3(R) hydroxybutyric acid]، حيث يمكن تعديل تركيب البوليمر من خلال إضافة مركبات سالفة، وذلك اعتماداً على السلالة المستعملة في التجربة. ومن ضمن البوليميرات المشتركة ذات الاهتمام التقني الخاص هي تلك التي تتألف من 3(R) hydroxybutyric acid و3(R) hydroxyvaliric acid التي تمتلك خصائص شبيهة بالبولي بروبيلين، لكنها قابلة للتفكك الحيوي كما أنها موائمة حيوياً. حالياً، يتم إنتاج هذه البوليميرات بكميات قليلة فقط (Biopol®). وقد تم مؤخراً تحقيق تطور اقتصادي بالتعبير عن المشغل الحيوي ـ أوبرون ـ (operon) PHB، الذي يتألف من ثلاثة جينات فقط، في نباتات مختلفة وبعطاءات مرتفعة، في حين يكمن التركيز الأساسي على تحسينات الاسترجاع (مثل الاستخلاص بمحاليل الهيبوكلور القلوية أو الميثيلين كلورايد (methylene chloride)).

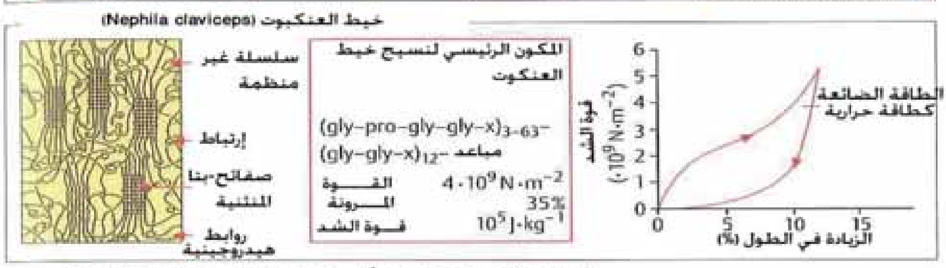
الفبروينات والسبايدروينات (Fibroins and Spirdroins): وهي بولي أميدات (polyamides) متنوعة جداً تنبثق من مغزال دودة القز (*Bombyx mori*) والعناكب (مثل، *Nephila claviceps*). تتميز هذه البوليميرات بخصائص تمطُّط وإمكانيات تقنية مرتفعة: يمكن لخيط العنكبوت أن يتمدد بنسبة 30٪ تقريباً قبل أن ينقطع. ويتشكل كلا النوعين من هذه البوليميرات (الفبروينات والسبيدروينات) من ببيتيدات متعددة على نحوٍ متكرر. وقد تم التعبير عنها في *E.coli.* و *Pichia pastoris* وكذلك في حيوانات محورة (transgenic animals) من خلال كاسيتات جينية مصنعة ومتكررة حيث تمت أمثلة استعمال شيفرتها بالنسبة إلى الكائن الحي المضيف. إلا أن العطاءات من الفبروينات والسبيدروينات المؤشَّبين لا تزال محدودة بحوالي $1gL^{-1}$ في مرق التخمير.

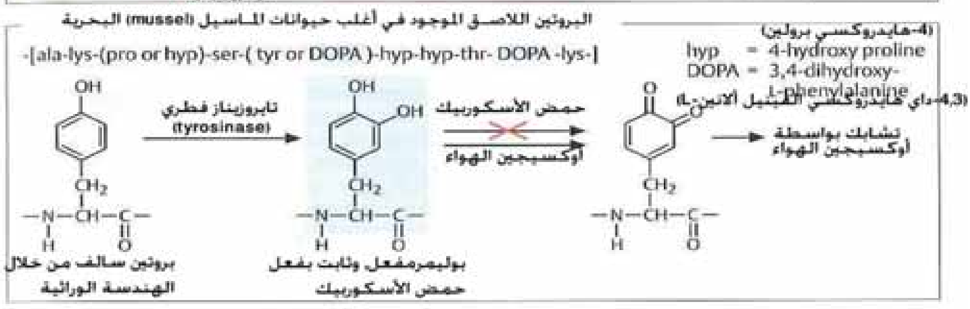
بروتين الالتحام (الالتصاق) (Adhesion protein): تلتصق المحاريات، مثل، *Mytilus edilis*، إلى الأسطح الملساء كقشرة السلطعون بواسطة بولي أميد، الذي يصبح قاسياً لدى تعرضه للماء؛ وبهذه الحيلة انتشرت المحاريات على مدى مسافات شاسعة. يبلغ M_R البروتين السالف لبروتين الالتحام الطبيعي هذا، حوالى 130000 Da، وهو يتألف بشكل أساسي من أحماض أمينية محبة للماء كالتايروزين (tyrosine)، والسيرين (serine)، والثريونين (threonine)، واللايزين (lysine) والبرولين (proline). وخلال الإفراز، تخضع ثمالات التايروزين والبرولين إلى تعديلات ما بعد الترجمة (posttransltional modifications) بإضافة مجموعة هيدروكسيل (hydroxylation) لتشكيل 3 أو 4 ـ هيدروكسي برولين (3 or 4-hydroxy-L-proline) -L وO ـ هايدروكسي تايروزين (O-hydroxytyrosine) (DOPA). وحالما يُفرز بروتين الالتحام هذا، تشكل هذه الثمالات، بوجود الأكسيجين، بنى شينويدية التي تُطلق بلمرة السلاسل الببتيدية. لقد أمكن الحصول على تعبير جيد للبروتين السالف في *E.coli*، وذلك باستخدام كاسيتات جينات لبروتين الالتحام مصنعة ومؤمثلة. إلا أنه بالنسبة إلى تعديلات ما بعد الترجمة المتعلقة بتكوين اللاصق (بروتين الالتحام)، فإن هذه الجينات لا يمكن أن تُنَسَّل (تُكَلْوَن) في الـ *E.coli.* لذلك يتم عزل البروتين السالف لكي تجري أكسدته بواسطة أنزيم التايروزيناز (tyrosinase) الفطري إلى ببتيد متعدد الهيدروكسيل (polyhydroxylated peptide)، ثم يضاف بعد ذلك حمض الأسكوربيك -L (L-ascorbic acid) لمنع استمرار الأكسدة. وهناك تحت التطوير، الآن، لاصق تجاري يعتمد على هذه المواد لتطبيقها في مجال علاج الأسنان.

البكتريوهودوبسين Bacteriorhodopsin (BR): تنمو البكتيريا *Halobacterium salinarium* في محلول ذي تركيز 3-5 M من ملح كلوريد الصوديوم (NaCl). وخلال عملية التحريض الضوئي، يقوم البروتين الشبكي BR بدور مضخة بروتينية موجهة إلى الخارج ما يؤمن الطاقة للخلية. كما يشكل تكتلات بلورية ثنائية الأبعاد (2D crystalline structures) في الغشاء الخلوي («الغشاء الأرجواني»، 75٪ بروتين، 25٪ دهون) تكون شديدة الثبات بحيث يتم عزلها مباشرةً. إن العامل المساعد للـ BR هو شبكي، كما أن التحول التصاوغي بين أشكال trans وcis (trans-cis-isomerization) المحرض ضوئياً مع إمكانية عكسه حرارياً هو أساس تحفيز الدورة الضوئية بمعدل تحول يصل حتى 100 مرة في الثانية. يكون BR أرجوانياً في حالته غير المحرضة (λ_{max} 570 nm) (ground state) وأصفر (λ_{max} 410nm)، (M intermediate) بعد نزع البروتون من قاعدة Schiff المتشكلة من الشبكة وlys^{216}. إن سرعة هذه الدورة الضوئية، وبالتالي التغيير اللوني يمكن التلاعب فيها من خلال تطفيرات محددة، وبذلك فإن BR وبروتيناته الطافرة تعتبر مواد ممتازة لتخزين المعلومات البصرية.

حمض البولي هايدروكسي ألكانويك		
	المنتج	المصنّع
Ralstonia eutropha	بوليمرات مترافقة من حمض 3- هايدروكسي بيوتيريك وحمض 3- هايدروكسي فاليريك-(3-hydroxyvaleric acid)	Metabolix (تجارية)
Escherichia coli	PHB، مشغل مكلون مأخوذ من *Alcaligenes latus*	ATO-DLO
Pseudomonads	بولي إستر ذي سلسلة جانبية تتراوح بين C_3 وC_9 أو السلسلة الجانبية للفينيل فاليريات (phenyl valeriate)	غير تجاري
rapeseed	PHB، مشغل كلون مأخوذ من *Ralstonia eutropha*	غير تجاري
أنواع الـ *Lactobacillus*	عديدات لاكتايد معدمة التناظر المرآتي من حمض اللبن-L	Cargill-Dow(تجارية)
مسار الـ *Klebsiella* المكلون في الـ *E.coli*	بوليمرات بروبان -3،1- دايول مترافقة مع تيريفتالات (terephtalate)	DuPont، Genecor









• التحويل الحيوي (Biotransformation)

عموميات (General). إن التحولات الحيوية هي وظائف أساسية للكائنات الحية وهي تنفع في عمليات التصنيع الحيوي (biosynthesis) أو التفكك الحيوي (biodegradation) للمستقلبات (metabolites) (بناء (anabolism) وهدم (catabolism)) وكذلك في إزالة السمّيّة (detoxification) للمركبات السامّة أو غير الطبيعية (الدخيلة (xenobiotics)). وكل خطوة في عمليات التحويل الحيوي هي محفزة بأنزيم. في التقانة الحيوية، تعتبر عادةً التحولات الحيوية مرادفةً للتحفيز الحيوي، ما يعني، تحويل المركبات السالفة الطبيعية أو المصنعة (المستخرج) إلى منتجات ذات قيمة أعلى. من الناحية التقنية، يمكن أن تنجز التحولات الحيوية إما بواسطة الكائنات المجهرية، خلايا الثدييات، أو الخلايا النباتية في مفاعل حيوي (التخمير) أو بواسطة أنزيمات أو خلايا معزولة (التي يمكن تثبيتها (immobilize) على مواد حاملة). حالياً، إن استعمال الخلايا أو الأنزيمات المهندسة وراثياً (مأشوبة (recombinant)) يزداد بسرعة. تعود تسمية عملية التحفيز الحيوي بـ «التحفيز الحيوي»، أو «التحويل الحيوي» أو «التخمير» (fermentation)، أو «التحفيز الأنزيمي» إلى الرغبة الشخصية، لأن جميع هذه العمليات يمكن أن تتطلب أنزيماً واحداً أو عدة أنزيمات. إن استعمال أنزيمات معزولة يمكن أن يبسط العملية حيث إن التحمل الحراري يكون أفضل، كما أنه لا حاجة إلى ظروف عقيمة وليس هناك إعاقة لانتشار المستخرج والمنتج. إلا أن استعمال أنزيم معزول قد لا يكون الاختيار الأفضل إذا كان هذا العزل مكلفاً، أو أنه غير ثابت أو يتطلب أنزيمات أو عوامل مساعدة (co-factors) إضافية.

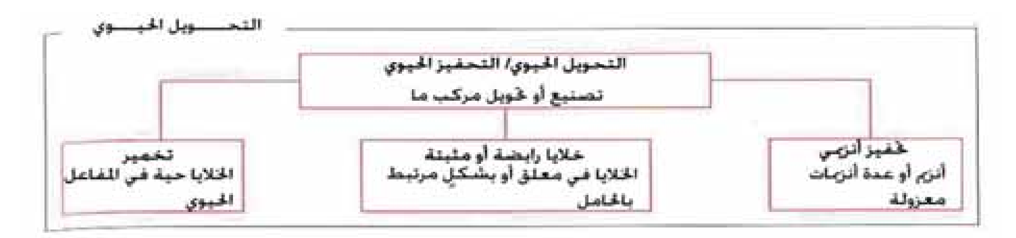
الكائنات المجهرية (Microorganisms): وهي تُستعمل لإنتاج مستقلبات (metabolites) طبيعية (مثل، حمض الغلوتاميك (glutamic acid)) وأيضاً في التحولات الحيوية للمركبات الأولية (substrates) غير الطبيعية (مثلاً في 11 لمشتقات الستيرويد (steroids) المصنعة). وبكون هذه التحولات هي عبارة عن تفاعلات محفزة أنزيمياً، فإنها تتم بطريقة انتقائية من حيث الموقع (regioselective) والفراغية (stereoselective). كما أنه نظراً إلى إمكانية تنسيل (كلونة) أو التعبير عن الجينات أو الكاسيتات الكاملة الجينية من كائنات أخرى في كائن مجهري مضيف فقد توسعت إلى حد كبير احتمالات التحولات الحيوية (مثلاً، من أجل الإنتاج الميكروبي للصباغ النيلي (indigo)). وهكذا سوف تساعد الهندسة الأيضية (metabolic engineering) وهندسة البروتينات إضافة إلى اكتشاف أنزيمات ومسارات جديدة من خلال سلسلة الجينوم في توسع الاستعمال الصناعي لتفاعلات التحولات الحيوية بشكلٍ أكبر.

خلايا الثدييات (Mammmalian cells): وهي تُستعمل على نطاقٍ واسع في الصناعة لإنتاج البروتينات الدوائية (مخمِّرات خلوية)، ولكنها عالية التكلفة بالنسبة إلى التحولات الحيوية ذات الخطوة الواحدة. يجري اختبارها في المجال الطبي، مثلاً، من أجل استعمالها في الكبد الإصطناعي لتحويل المستقلبات السامة الموجودة بالدم وربطها بالألبيومين.

الخلايا النباتية (Plant cells): وقد تمّت دراستها في التحولات الحيوية، مثلاً، لإضافة مجموعة الهيدروكسيل على الموقع 12 (12-hydroxylation) في digitoxin وتحويله إلى digoxin باستخدم مزارع *Digitalis lanata* الخلوية. ومقارنةً بالتصنيع الكيميائي أو الكائنات المجهرية المأشوبة (recombinent)، فقد حققت مزارع الخلايا النباتية نجاحاً محدوداً في العمليات الصناعية.

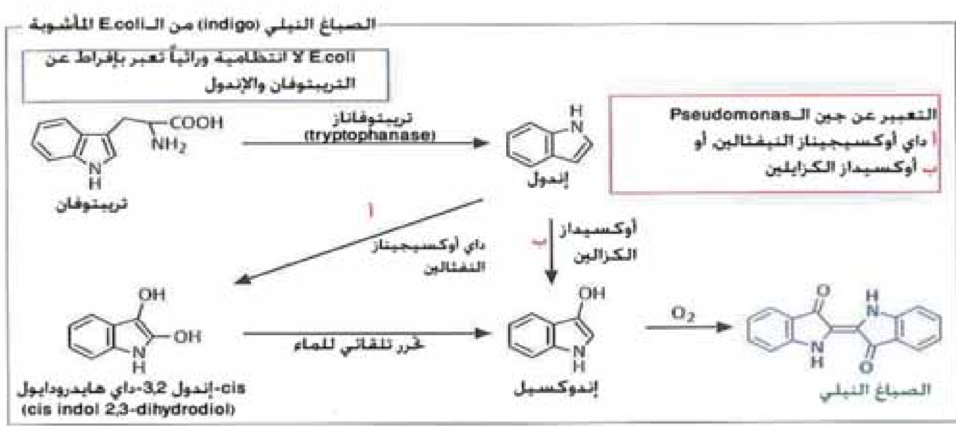
التحفيز الأنزيمي (Enzyme catalysis): عادة ما تُستعمل الأنزيمات في التحولات الحيوية ذات الخطوة الواحدة. وفي معظم العمليات، تستعمل الأنزيمات المعزولة بصورة حرة أو مثبتة (immobilized)، ولكن إذا تبين أن عزل الأنزيم عالي التكلفة، فإنه يمكن استعمال أنزيم فعال في كائن حي كامل معطل الفعالية (inactivated) (مثلاً، أنزيم مصاوغة (أيزوميراز) الغليكوز (glucose isomerase) في خلايا الـ streptomyces). تشمل معظم الأمثلة الصناعية للتحولات الأنزيمية استعمال أنزيمات الهيدرولاز (hydrolases) حيث إنها لاتتطلب عوامل مساعدة (co-factors) وغالباً ما تحفز تفاعلات ذات انتقائية موقع (regioselective) وانتقائية فراغية (stereoselective). وقد وجدت أيضاً تفاعلات المصاوغة الأنزيمية وكذلك تفاعلات الإضافة (addition reactions) إلى الرابطة المزدوجة، أو مجموعات الكربونيل أو روابط CH المفعلة تطبيقات صناعية.

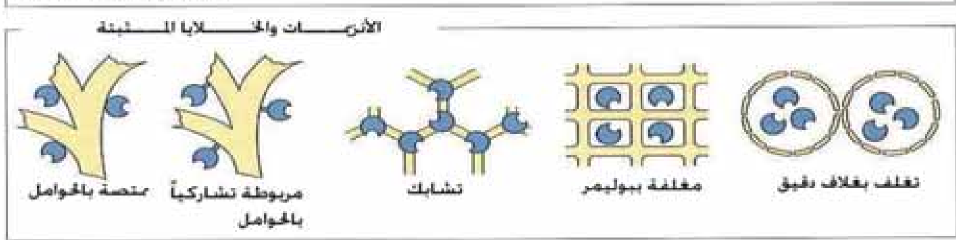
مسارات أيضية مأشوبة (Recombinant metabolic pathways): تضم الأمثلة الهامة على ذلك إنتاج حمض الأسكوربيك L- (L-ascorbic acid) من طافر *Erwinia herbicola* والصباغ النيلي (indigo) من طافر *E. coli*. فلإنتاج الصباغ النيلي، يتم تنسيل (كلونة) أنزيم نيفثالين داي أكسيجيناز (naphthalene dioxygenase) المأخوذ من النوع البكتيري *Pseudomonas* في الـ *E.coli* ثم تبع ذلك أمثلة المسار الأيضي (metabolic pathway) الجديد من خلال الهندسة الوراثية للكائن المضيف. لقد جرى هندسة الجينات التي تشفر (coding) لتحويل الغليسرول (glycerol) إلى بروبان 3، 1 ـ داي أول (propane 1 3-diol)، الموجودة في *Klebsiella pneumoniae* في الـ *E.coli*، مما سمح بالإنتاج التجاري لوحدات بناء البولي إستر (polyester) من نشاء الذرة المتحلل (hydrolyzed). كما أنه من ضمن التفاعلات الأخرى لهذا الطراز التفكك الحيوي (biodegradation) للمواد الغريبة (xenobiotics) في البيئة. وهكذا فقد أصبحت الهندسة الأيضية طريقة أساسية لأمثلة الكائنات المأشوبة على ضوء إنتاجيتها العالية.



تفاعلات التحويل الحيوي (أمثلة)

	الكائن الحي/الأنزيم	النوع	الشركة
سوربيتول-D ---> سوربيتول-L	*Acetobacter suboxydans*	تخمير	Roche
فينيل لاكتات-D---> 4-هايدروكسي فينيل لاكتات-D	*Beauveria gossypii*	تخمير	BASF
حمض الفوماريك---> حمض الأسبارتيك-L	*Escherichia coli*	خلايا مثبتة	DSM،Tanabe
غلوكوز-D---> فروكتوز-D	غلوكوز ايزوميراز من أنواع *Streptomyces*	خلايا مثبتة، أنزيمات مثبتة	Clinton،Novo
أسيتوكسي ميثوكسي فينيل إيثيل أمين-D،L---> فينيل إيثيل أمين-L	الليباز من *Pseudomonas cepacia*	أنزيمات مثبتة	BASF
تريبتوفان---> الصباغ النيلي	سلالة *E.coli*-Stamm المأشوبة	خلايا مثبتة مأشوبة	Genencor
غلوكوز---> بروبان3،1-دايول	*E.coli* مع مسار *Klebsiella*	خلايا مثبتة مأشوبة	Genencor،DuPont





• التحولات الحيوية للستيرويد

(Steroid biotransformations)

عموميات (General). الستيروئيدات هي صنف من الكيماويات التي أمكن تطبيق التحولات الحيوية عليها بنجاح.

الستيروئيدات: تضم هذه المجموعة الضخمة من المركبات أكثر من 10000 مركب طبيعي ومصنع. ويستعمل العديد منها في علم الأدوية، من أمثلتها: الفيتامين D (الكالسيفيرول (calciferol))، مضادات الالتهاب (الكارتيكوستيريد (corticosteroid))، مانعات الإباضة (الإستروجين (estrogen) والبروجستين (progestins))، مضادات الودمة (anti-arhythmics) (غلايكوزيدات قمعية (digitalis glycosides)) ومدرات البول (spironolactone). هناك عدة أنواع من تفاعلات التحولات الحيوية تُستعمل في إنتاج الستيروئيدات على مستوى صناعي؛ فمن الأمثلة الهامة تفكك السلسلة الجانبية لـ إلى androsta-4-ene- 3 ،17-dione (AD)، androsta-1 ،4-diene-3 ،17-dione (ADD) و11 لـــ cortexolone («Reichstein S»). وقد تم تحقيق تصنيع البريغنينولون (pregnenolone) من السكر بشكل كامل باستعمال الخميرة المأشوبة (recombinant) الحاملة لعدة جينات غريبة؛ إلا أن اقتصاديات هذه العملية، كما هو الحال في الصباغ النيلي وحمض الأسكوربيك، لا يمكن أن تنافس عملية الإنتاج التقليدية حتى الآن.

تفكك السلسلة الجانبية (Sidechain degradation): لقد كان الـ diosgenin، وهو مركب طبيعي مأخوذ من جذور مكسيكية، مادة أساسية في تصنيع الستيرويدات (steroids) على مستوى صناعي. وكانت أحماض الصفراء من مرارة الحيوانات والستيغماستيرول (stigmasterol)، وهو منتج ثانوي في عملية إنتاج فيتامين E من زيت الصويا، مواد أولية (خام) أخرى لإنتاج الستيرويدات. وحيث إن التصنيع الكيميائي للكورتيكوستيرويد (corticosteroids)، أوالإستروجين (estrogens) أو السبيرونولاكتون (spironolactone) من مواد البدء هذه يتطلب عدداً كبيراً من الخطوات، فإن تفكيك السلسلة الجانبية للستيرولات (steroles) النباتية (مثل، المعزول من بذور اللفت أو الصويا) أصبح بديلاً صناعياً جذاباً. تمتلك هذه المقدرة البكتيريا الخُيَيطية (actinomycetales) كالـ Mycobacterium، والـ Nocardia، والـ Arthrobacter والـ Corynebacterium؛ حيث تستطيع أن تفكك السلسلة الجانبية للستيرولات النباتية (phytosterols) مباشرة إلى وسائط ستيرويدية مثل androsta-4-ene-3، 17- dione (AD) أو androsta-1، 4-diene-3، 17-dione (ADD)، التي هي مواد بدء لتصنيع الإستروجينات (estrogens) والبروجيستينات (progestins)، كما يمكن أن تستعمل أيضاً لإضافة سلاسل جانبية كيميائياً، على الموقع 17، التي تؤدي إلى الـ corticosteroids. وكذلك أيضاً فقد استُعمل الكوليسترول أو أحماض الصفراء كمواد بدء في هذا النوع من التحولات الحيوية، ولكن بنجاح اقتصادي أقل.

الهيدروكسيل على الموقع 11β 11β-Hydroxylation: اعتماداً على الغربلة الميكروبية على مدى عقودٍ عديدة، أصبحت اليوم مجموعات الزرعات تحتوي على كائنات مجهرية قادرة على أن تضيف مجموعة الهيدروكسيل (hydroxylate) بصورةٍ أكثر أو أقل انتقائية إلى جميع المواقع على حلقة الستيرويد. إن أكثر خطوة إضافة هيدروكسيل على مستوى صناعي أهمية هي 11 للمركب Reichsteins S، الوسيط الكيميائي في تصنيع الهايدروكورتيزون (hydrocortisone)؛ حيث يستعمل الفطر *Curvularia lunata* في هذا التحول. ولأن النشاطات الأخرى لهذا الكائن الحي ستؤدي إلى إضافة مجموعة هيدروكسيل عند الموقع α 7 و14α أيضاً، فإن -α 17 acetate ester لـ Reichstein S يُستعمل كمركب أولي، ولكن ليس من أجل إضافة الهيدروكسيل على الموقع 11β، 11) βhydroxylation). تجري خطوة التحول الحيوي المرغوبة في هذا النظام بانتقائية فراغية عالية، وذلك لأن التفاعلات الجانبية غير المرغوبة تعاق بالتأير التجسمي الفراغي (sterically) بشكل تام. وتستعمل أيضاً في الصناعة عمليات إضافة مجموعة الهيدروكسيل ميكروبياً إلى المواقع الأخرى مثل 7α و9α و11α أو 16α لإنتاج ستيرويدات متخصصة.

التصنيع الحيوي للبريغننولون (Pregnenolone) من السكر: إن المقاربة التجريبية الحديثة لإنتاج البريغننولون هي عبارة عن سلالات من الخميرة المأشوبة التي بإمكانها تشكيل البريغننولون من السكر. تشكل *Saccharomyces cerevisiae* خلال نموها الإرغوستيرول (ergosterol) كأحد مكونات غشائها. إلا أنه في السلالة المأشوبة أعيق التفكك التأكسدي (oxidative degradation) لهذا المايكوستيرول (mycosterol) بإيقاف جين. وقد أدى التنسيل والتعبير الوظيفي (functional expression) لثلاثة جينات بقرية منخرطة في أيض (metabolism) الستيرويدات وكذلك لجين δ7-reductase من النبات *Arabidopsis thaliana*، على الكروموزومات VIII وXV وIII للخميرة، إلى سلالة قادرة على أن تشكل البريغننولون من الغلاكتوز -D (D-galactose). كما قاد التنسيل الإضافي لأنزيم نازعة الهيدروجين من ـ ديهادرجيناز ـ 3 (3dehydrogenase) في هذه الطافرة إلى تشكيل البروجيستيرون (progesterone). إن التجارب الآن مستمرة لإتمام هذا المسار بالتعبير الوظيفي عن β11 و17α و21-hydroxylases البقرية من أجل الحصول على تشكيل الهيدروكورتيزون (hydrocortisone) من الـ -D galactose في خطوة تخمير واحدة؛ إلا أن العطاء لا يزال بعيداً من أن يكون منافساً من الناحية الاقتصادية.

مــــواد البـــــدء وخطـــــــوات التحــــويل

حمض الديأوكسيكوليك
(deoxycholic acid)

دايوزجينين
(diosgenin)

ستيغماستيرول
(stigmasterol)

26 خطوة

5 خطوات

4 خطوات

كورتيزون
(cortisone)

بروجستيرون
(progesterone)

بيتا-سيتوستيرول
(B-sitosterol)

7 خطوات

تفاعلات إضافة الهايدروكسيل باستخدام الكائنات المجهرية

أندروستا-4-إين-17,3-دايون
(androsta-4-ene-3,17-dione (AD))

إستروجين(estrogen) ، جيستاجين(gestagens)

خطوات كيميائية

تخمير

مادة البدء المتوفرة على مستوى صناعي

إضافة الهايدروكسيل في الموقع 11بيتا للـReichestein S باستخدام Curvularia

Reichestein S -17-أسيتات

هايدروكسي كورتيزون-17-أسيتات

هايدروكورتيزون
(hydrocortisone)

تم كبح الإضافة غير المرغوبة للهايدروكسيل في المواقع 7 ألفا و14 ألفا بواسطة إضافة مجموعة الأسيل في الموقع 17

تصـــــنيع الســـــتيرويد باســـتخدام الخميـــرة المأشوبة

D-غلاكتوز

إيرغوستيرول
(ergosterol)

بريغنينولون
(pregnenolone)

3بيتا-الهايدروكسي ستيرويد ديهادروجيناز البشري
3B-hydroxysteroid)
(dehydrogenase

بروجيستيرون
(progesterone)

[1] Saccharomyces cerevisiae الأيض الطبيعي عند

[2] جينات مكلونة من البقر والـArabidopsis thaliana

[3] جين بشري مكلون

الأنزيمات

الأنزيمات (Enzymes)

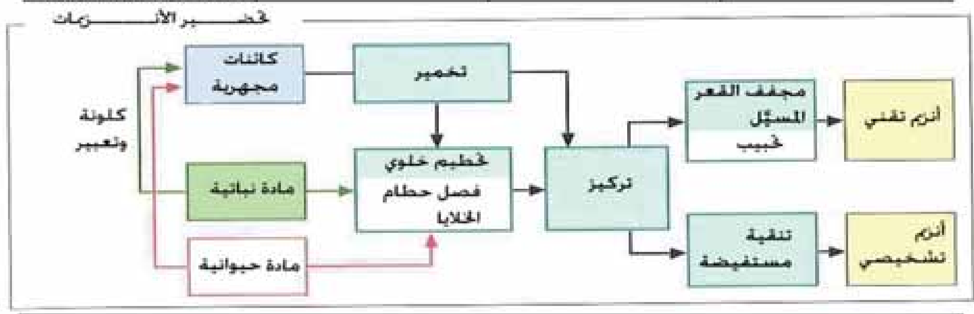
عموميات (General). بدأ منذ مئة عام تقريباً تطوير أنزيمات متنوعة معزولة من الحيوانات والنباتات والكائنات المجهرية لتستخدم كمكونات هامة في عمليات تقنية وفي كواشف التحليل. وحوالى عام 1970 تم تطوير الأنزيمات المثبتة (immobilized) للتحفيز الحيوي الصناعي (التحويل الأنزيمي). كما زادت الهندسة الوراثية هذه الإمكانية بتقديم كلا الأنزيمات النقية والمعدلة وراثياً.

تصنيف الأنزيمات (Enzyme classification). تبعاً للاتفاقيات الدولية، قُسمت الأنزيمات إلى ستة أصناف تبعاً لوظيفتها. هناك عدة آلاف من الأنزيمات المتنوعة الوظائف معروفة، وقد تم عزل أشكال إضافية لأغلبها من كائنات حية مختلفة، إلا أن خصائص هذه الأنزيمات عادة ما تكون غير مناسبة للاستخدام في الصناعة. على سبيل المثال، يعمل حوالى ثلث الأنزيمات في بيئة الأغشية الحيوية (biological membranes)، وهي تكون غير ثابتة (unstable) بشكلها المعزول؛ إذ تتطلب فعالية غالبية أنزيمات الأكسدة والاختزال (oxidoreductases)، والترانسفيراز (transferases)، والليغاز (ligase) والتنشؤ ـ سينثاز ـ (synthases) وجود عوامل مساعدة (cofactors) كالـ NADH، ATP أو الأنزيم المساعد A (coenzyme A)، التي هي عوامل مرتفعة الثمن ويجب إعادة توليدها لأسباب اقتصادية. أما أنزيمات الهيدرولاز (hydrolases) والمصاوغة (isomerases) فلا تشترك بهذه السيئات، لذا فهي تعتبر من الأنزيمات المفضلة في التطبيقات الصناعية. لكن انتقائيتها في مجالات التحليل (analysis) والتشخيص (diagnosis) تبرر سعرها المرتفع مما يؤدي إلى استخدام جميع أنواع الأنزيمات على حدٍّ سواء.

التصنيع (Manufacture). تتغير طرائق الإنتاج بشكل كبير تبعاً لمصدر الأنزيم (حيواني، نباتي، أو من الكائنات المجهرية)، والاستخدام المقصود (درجة النقاوة اللازمة)، ومستوى حجم الإنتاج. كما تعتبر خصائص الأنزيم المرغوب (منحل أو مرتبط بغشاء، ثابت أو غير ثابت) من العوامل الأخرى التي تحدد بشكل كبير بروتوكولات عزل الأنزيم وتنقيته. فإذا كانت كميات كبيرة من الأنزيم مطلوبة للتطبيق التقني (مثل أنزيمات البروتياز (protease) الميكروبية لاستخدامها في المنظفات)، فإنه يُفضَّل إنتاج الأنزيم الخارج خلوي (extracellular) بالتخمير، وذلك لبساطة الخطوات اللاحقة، مثل، فصل الخلايا، أو تركيز مرق التخمير (fermentation broth) بالترسيب أو الترشيح الفائق (ultrafiltration)، أو التجفيف اللطيف بمجفف رذاذ (spray drier أو دوَّام (vertex drier)، أو إضافة مركبات مثبِّتة (stabilizing compounds). وتكون عادةً مستحضرات الأنزيم الناتجة بمثل هذه العمليات قليلة النقاوة، وفي أغلب الأحيان ملوثة بأنزيمات أخرى (لكنها في الواقع يمكن أن تكون مفيدة في التطبيق المرغوب). وعلى العكس من ذلك، فإن المستحضرات الأنزيمية المستخدمة في العلاج (مثل، الـ tPA والـ DNAse) أو في التشخيص، فيجب أن تكون عالية النقاوة. وهي غالباً ما يتم انتاجها داخل الخلايا، ثم يجري عادةً عزلها وتنقيتها بعدة خطوات في الكروماتوغرافيا (Chromatography) للوصول إلى فعالية أنزيمية واحدة، ما يبرِّر سعرها المرتفع في السوق. يجري رصد نقاوة الأنزيم المحضر من خلال: 1) تحديد الفعالية النوعية (المحددة) في كل خطوة من خطوات التنقية، 2) تحديد انخفاض الفعاليات الجانبية (side-activities) غير المرغوبة، 3) طرائق الهجرة الكهربائية (Electrophoretic methods). وقد أحدثت الهندسة الوراثية ثورة في إنتاج الأنزيمات؛ إذ إن العديد من الأنزيمات المستخدمة اليوم في الصناعة تم إنتاجها بإجراءات التخمير القائمة على استخدام مضيف من الكائنات المجهرية المأشوبة (recombinant). وتتمثل الميزة الخاصة لهذه العمليات بوجود فعاليات جانبية أقل مع إمكانية الحصول على مستحضر أنزيمي نقي من خلال خطوات تنقية بالكروماتوغرافيا أقل، ما يخفف من كمية المخلفات.

التسجيل (Registration). إن الأنزيمات هي مركبات طبيعية، لذا يمكن استخدامها بدون قيود في كافة التطبيقات، ماعدا إنتاج الأغذية والعلاج الطبي، وذلك إذا ما تم إنتاجها بالشكل المناسب تبعاً لإجراءات الـ GMP (ممارسة التصنيع الجيد). كما تُعتبر الإضافات الغذائية المحضرة من منتجات طبيعية بوسائل تقانة الأنزيمات، طبيعيةً ولا حاجة إلى ذكرها في مكوّنات المنتج الغذائي (مثل: ايزوغلوكوز (isoglucose)). وفي حالة إضافة أنزيمات إلى منتجات غذائية، فإن الكائن الحي المستخدم لإنتاج الأنزيم يجب أن يكون بمنزلة الكائنات «الآمنة بشكل عام» (Generally Recognized As Safe (GRAS)). وهو يُطبَّق على النباتات والحيوانات، وعلى عدد محدد من الكائنات المجهرية التي تمتلك تاريخاً طويلاً من الاستخدام في إنتاج الأغذية المخمرة (تعليمات جمعية إجراءات الأغذية والأنزيمات الميكروبية Association of Microbial Food and Enzymes Procedures (AMFEP)). أما الأنزيمات من كائنات مجهرية أخرى، فإنها تتطلب إجراءات تسجيل معقدة ومكلفة، ما يجعلها عائقاً اقتصادياً في أغلب الأحيان. وقد جرى أيضاً تطبيق قيود مماثلة على استخدام الأنزيمات المأشوبة (recombinant) في عمليات تصنيع الأغذية.

تصنيف الأنزيمات			
رقم التصنيف الأنزيمي (EC-number)	الاسم	الأنزيم المساعد	المثل
1.x.y.z	أنزيمات الأكسدة والاختزال– أوكسيدوريدكتاز		
1.1.y.z	تتفاعل مع CH-OH	NAD^+،$NADP^+$،PQQ	ديهادروجيناز الكحول
1.1.3.z	تتفاعل مع CH-OH	FAD^+	أوكسيداز الغلوكوز
1.3.y.z	تتفاعل مع C-H	الهيم (heme)، Fe^{2+}	هيدرولاز الستيرويد في الموقع β11
2.x.y.z	أنزيمات الترانسفيراز		
2.4.y.z	تنقل مجموعات الغلايكوزيل		ترانسفيراز الغلوكوزيل
2.6.1.z	تنقل الـNH إلى مموعات الكاربونيل	بايريدوكسال فوسفات (pyridoxal phosphate)	ترانس أميناز
3.x.y.z	الهيدرولاز		
3.1.y.z	تحلل الروابط الإستيرية		ليباز ، إستيراز
3.2.y.z	تحلل الروابط الغلايكوزيدية		ألفا–أميلاز
3.4.y.z	تحلل الروابط الببتيدية		سابتيليزين (subtilisin)، تريبسين (trypsin)
4.x.y.z	أنزيمات اللاياز		
	تحفز تفاعلات الإقصاء بتشكيل روابط مضاعفة أو إضافة مجموعة إلى هذه الروابط		
4.3.y.z	إضافة أو إقصاء الـNH إلى/من الروابط المضاعفة C=C		الأسبارتاز
5.x.y.z	أنزيمات المصاوغة– الأيزوميرز		
5.1.y.z	جعل الأحماض الأمينية –D و –L راسيمية		راسيماز الألانين
5.3.y.z	أنزيمات الأكسدة والاختزال داخل الجزيء		أيزوميرز الكزايلوز (الغلوكوز)
6.x.y.z	أنزيمات الليغاز		
6.2.y.z	قرن C-S	ATP،CoASH	سينثاتاز الأسيتيل كو A (acetyl-CoA synthatase)



التسجيل		
الأصل	الأمثلة	توصيات
أعضاء الحيوان	مستخلصات البنكرياس، مادة الرينين، البيبسين (pepsin)	ممارسة التصنيع الجيد GMP
المادة النباتية	بابايين (papain)، بروميلاين (bromelain)	ممارسة التصنيع الجيد GMP
الكائن المجهري أ) استُخدم تقليدياً لإنتاج المنتجات الغذائية	*Aspergillus niger* ، *Bacillus sbtilis*، *A. oryzae*، *Mucor javanicus*، أنواع *Thizopus*، *Saccharomyces cerevisiae*، *Kluveromyces fragilis*، *K. lactis*، *Leuconostoc oenus*، كائنات حية من مزارع بادئة.	تُعتبر آمنة بشكل عام(GRAS): فحوصات بسيطة تكفي. (توصيات جمعية إجراءات الأغذية والأنزيمات الميكروبية (AMFEP)).
ب) أنزيمات من كائنات مجهرية معروفة جيداً	*B. stearothermophilus* ، *B. liqueniformis*، *B. coagulans*، *B. megaterium*، *B. circulans*، *Klebsiella aerogenes*	يُطلب للتسجيل إجراء تجارب شاملة.

• التحفيز الأنزيمي (Enzyme catalysis)

عموميات (General). تستخدم الأنزيمات في التصنيع الكيميائي، وذلك يعود إلى طاقاتها المناسبة وانتقائيتها من حيث الموقع (Regioselectivity) والفراغية (stereoselectivity) («التقانة الخضراء»). إن الأنزيمات التي لا تتطلب أنزيمات مساعدة (coenzymes) هي المفضلة للاستخدام. وأهم الأمثلة على ذلك:

أنزيمات الأكسدة والاختزال (Oxidoreductases). تم تصنيف حوالى 980 نوعاً مختلفاً من أنزيمات الأكسدة والاختزال. فأنزيمات الأوكسيداز تحتوي عادةً على الـ FAD المرتبط بشكلٍ موطَّد، كعامل مساعد، وبالتالي يمكن استخدامها في شرائح الفحص التحليلية. وأنزيمات نازعات الهيدروجين (dehydrogenases) هي مفيدة جداً في كل من التطبيقات التحليلية والتصنيعية، حيث إن تفاعلها يقود إلى توازنات؛ وعليه، فإنه يمكن استعمالها في أكسدة مجموعات الهيدروكسيل (hydroxyl oxidation) أو اختزال مجموعات الكاربونيل (carbonyl reduction). أما في التطبيقات التقانية، فيجب إضافة أنزيماتها المساعدة الباهظة الثمن، عادةً الـ $NAD(P)^+$ أو الـ NAD(P)H، أو يجب إيجاد تفاعل مقترن غير مُكلف لإعادة توليد هذه الأنزيمات المساعِدة. لقد حصل خرق عندما استُخدم أنزيم نازعة الهيدروجين من ـ ديهادرجيناز ـ الفورمات (formate dehydrogenase)، المأخوذ من فطر *Candida boidinii*، والـ NAD(P)H، كأنزيم مساعد، المرتبط بالبولي إيثيلين غلايكول (PEG)، مع أنزيمات نازعات الهيدروجين ضمن مفاعل الغشاء الأنزيمي (enzyme membrane reactor)، ما أدى إلى تحوُّل (إزاحة) التوازن نحو أكسدة كاملة للمركب الأولي وذلك نتيجة تشكل الـ CO_2 كمنتج مقترن. مؤخراً، يتزايد الاهتمام بالاستخدام التقاني لأنزيمات البيروكسيداز (peroxidases)، والداي أكسيجيناز (dioxygenases) وأنزيم الأكسجنة الأحادية ـ مونوأكسيجيناز ـ (monooxygenases) الـ P450؛ إذ إنها جميعها قادرة على أكسدة روابط الكاربون ـ الهيدروجين غير المفعلة بطريقة انتقائية من حيث الموقع والفراغية، وهي غالباً ما تحتوي على تجمُّع Fe-S الشديد الارتباط أو مجموعة الهيم «heme» كعامل مساعد.

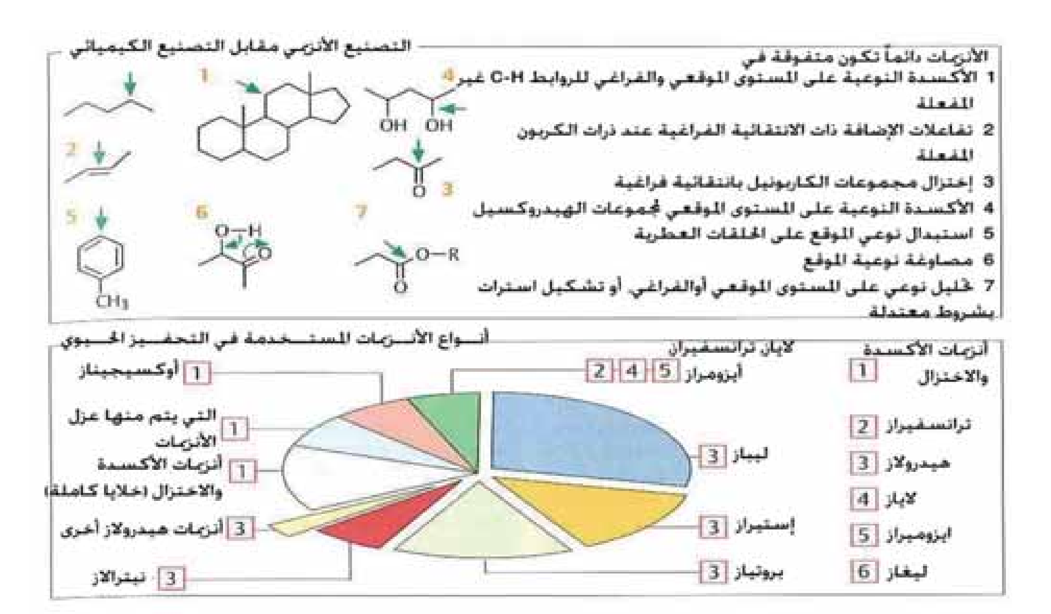
الترانسفيريز (Transferase). تضم حوالى 1019 نوعاً من الأنزيمات. وهي غير مستخدمة حالياً في التطبيقات التقانية.

أنزيمات الهيدرولاز (Hydrolases). وهي المجموعة الأكثر أهمية من بين الأنزيمات ذات الاستخدام التقاني. تضم 1002 نوع من الأنزيمات، من بينها أنواع اللايباز (lipases)، الاستيراز (esterases)، الأميلاز (amylases)، والبروتياز (proteases) التي لاقت أعظم التطبيقات التقانية. وإذا تم ضبط محتواها من الماء والفعالية المائية بشكلٍ كامل، فعندئذٍ يمكن استخدام هذه الأنزيمات لتشكيل الاستير (ester) وروابط الأميد (amide bonds) بانتقائية موقع وفراغية. فعلى سبيل المثال، إن أنزيم الثيرمولايزين (thermolysine) المأخوذ من *Bacillus stearothermophilus*، يُستخدم في أسترة (esterification) الأسبارتات ذي الوضعية L (L-aspartate) وميثيل استر الفينيل ألانين (L-penyllanin mthylester) -L بانتقائية موقع، لإعطاء مركب الأسبارتام (aspartame) المُحلي؛ كما يستخدم أنزيم البينيسيلين أميداز (pencillin amidase)، المأخوذ من *E. coli*، بشكل واسع لتصنيع البينسيلينات شبه المصنعة من 6 ـ أمينو حمض البينيسيلانيك. أما انزيمات اللايباز المأخوذة من *Burkholderia cepacia* فتُستخدم في تصنيع الأمينات المنعدمة التناظر المرآتي من مركبات الأميد الراسيمية، وتلك المأخوذة من *Rhizomucor miehei* تُستخدم بشكلٍ واسع في تصنيع بدائل زبدة الكاكاو. وفي النهاية، يستخدم أنزيم الأمينو أسيلاز (amino acelase) في تحليل الأحماض الأمينية المؤسيلَة عند ذرة النيتروجين (N-acyl amino acids) الراسيمية.

أنزيمات اللاياز (Lyases). وتضم 341 مثالاً، غالبيتها مستقلة عن العامل المساعد. إن أنزيم الأسبارتاز المأخوذ من *E.coli*، هو أنزيم من مجموعة اللاياز يُستخدم في تصنيع حمض الأسبارتيك ذي الوضعية (L-aspartic acid) -L من حمض الفوماريك (fomaric acid) على مستوى تقاني، من خلال طريقة الخلايا المثبتة بدلاً من الأنزيم الحر. وكذلك أيضاً أنزيم الأكريلونيتريل هيدراتاز (acrylonitrile hydratase) المأخوذ من *Pseudomonas chloraphis*، الذي يحفز إضافة الماء إلى الأكريلونيتريل، مشكِّلاً الأكريلاميد، وهو مونومر البولي أكريلاميد؛ وأنزيمات الأوكسي نيتريلاز (oxynitriases) التي تسمح بإضافة الـ HCN بانتقائية فراغية إلى مركبات الكاربونيل، ما يُفضي إلى أحماض الهايدروكسي -D أو -L المنعدمة التناظر المرآتي وذلك بعد تحليل مجموعة النتريل؛ وأنزيم الألدولاز، المأخوذ مثلاً من كبد الأرنب، فإنه يقوم بتصنيع سكريات متنوعة من وحدات بناء مناسبة؛ وأنزيمات لاياز البيكتات والبكتين المستخدمين في الصناعة الغذائية.

أنزمات المصاوغة (Isomeraes). وهي مجموعة صغيرة من الأنزيمات تضم فقط 147 أنزيماً، كما أنها لا تحتاج إلى أنزيم مساعد. من بين هذه الأنزيمات، مصاوغ الغلوكوز (glucose isomerase) الذي يُستخدم في الصناعة لمصاوغة الغلوكوز -D جزئياً إلى الفروكتوز D، ما يعطي شرابات إيزوغلوكوز عالية التحلية. عادة ما يستخدم هذا الأنزيم ضمن خلايا معطلة ومثبتة من الكائنات المجهرية المنتجة له، التي تكون في أغلب الأحيان من الـ streptomyces.

الليغاز (Ligases). إن جميع أنزيمات الليغاز التي تبلغ 122 أنزيماً تعمد على الـ ATP (ATP-dependent) لكي تعمل. لذا فإن استخدامها في عمليات تقانية يتطلب إعادة توليد الـ ATP. إلا أنه، وعلى الرغم من توصيف عمليات إعادة توليد الـ ATP مخبرياً، فإن هذه الأنزيمات لا تزال غير مطبقة على المستوى الصناعي.



العمليات الأنزيمية في الصناعة

	العملية	الأنزيم	مستوى الإنتاج (طن/سنة)	الشركة (أمثلة)
3	تحليل البنسيلين G إلى حمض 6–أمينو بينسيلينيك	بينسيلين أميداز * من *E.coli*	40000	DSM
3	تحليل أحماض أمينية N–أسيل–L،D إلى أحماض أمينية–L	أسيلاز * من أنواع *Aspergillus*	5000	Degussa ،Tanabe Seiyaku، DSM
4	إضافة NH_3 إلى حمض الفوماريك ليعطي حمض أسپارتيك–L	أسپارتاز * ضمن *E.coli*	10000	Tanabe Seiyaku
3	تحليل النشاء إلى مالتوز–D وغلوكوز–D	∝–أميلاز ، غلوكوأميليز	100000	عدة شركات
5	مصاوغة غلوكوز–D إلى فروكتوز–D	غلوكوز إيزوميريز * ضمن أنواع *Streptomyces*	100000	Clinton، منتجات الذرة وآخرين
3	تصنيع الأكريلاميد من الأكريلونيتريل	هيدراتاز النيتريل * ضمن *Pseudomonas chloraphis*	30000	Chemicals Nitto
3	تحليل الفينيل أميد الراسيمي إلى أمين غير متناظر	لايباز * من *Burkholderia cepacia*	10000	BASF
3	توزيع الجزيئات التبادلي لزيت النخيل مع استيرات ميثيل حمض الستيريك لإعطاء بديل زبدة الكاكاو	لايباز * من *Rhizomucor miehei*	1000	Unilever
3	نزع هالوجين الـ 1–كلوروبروبان ديول	ديهالوجيناز * من كائنات حية محبة للحرارة	تحت التطوير	Dow Chemicals

* بالشكل المثبت

الأنزيمات التحليلية (Analytical enzymes)

عمـوميـات (General). إن جـمـيـع أفـراد الأصـنـاف الأنـزيـمـيـة الستـة يـجري استـخدامـهـا في أغـراض التـحـلـيل (analysis) أو التشخيص (diagnosis). وتكمن الميزة الأساسية لهذه الأنزيمات في تخصصها (النوعية) الشديد تجاه مركبها الأولي (substrate)، الذي يسمح بكشف انتقائي لمكونات ضئيلة جداً في مزيج معقد. ولضمان أعلى تخصص (specificity) ممكن، فإنه يجب أن يخلو المستحضر الأنزيمي من أي أنزيم آخر قد يتدخل بالتطبيق المقصود، لذلك تكون الأنزيمات المستخدمة في التحليل والتشخيص على نقاوة معتبرة. إن العديد من عمليات التحديد التحليلي بالأنزيمات يمكن تنفيذها بسهولة من خلال استخدام طقوم (Kits) من الكواشف (reagents) التجارية والروبوتات المخبرية المؤتمتة أو من خلال شرائح الاختبار (test strips). كما يمكن أيضاً استخدام الأنزيمات كمجموعات مبلِّغة (reporter groups) تشير إلى حدوث الارتباط، مثلاً، الارتباط بالأجسام المضادة أو شُدف (fragments) الـ DNA؛ حيث إنه إذا كان المركب الأولي للأنزيم موجوداً بشكل فائض في مثل هذه المعايرات (assays)، فإن الإشارة الناتجة من حادثة الارتباط تتضاعَف بشكل كبير. لقد بلغت عام 2002 قيمة السوق العالمي للكواشف التشخيصية (diagnostics) المعتَمِدة على الأنزيمات حوالى 10 بلايين دولار أمريكي.

مبدأ القياس (Principle of measurement). عادةً ما تُستخدم معايرات القياس الضوئي (photometric)، أو الفَلْوَري (fluorometric) أو التألقي (luminomeric) في قياس التفاعلات الأنزيمية. وفي حالة تعذر القياس المباشر للمركب الأولي أو لمنتج التفاعل الأنزيمي الأساسي، فإنه غالباً ما تُستخدم سلسلة من الأنزيمات (enzyme cascade) الإضافية، مثل أنزيم نازعة الهيدروجين ـ ديهادرجيناز ـ المعتمد على الـ NAD(P)H كأنزيم مؤشر (NAD(P)H-dependent dehydogenase) (indicator)؛ حيث يمكن رصد تشكل أو استهلاك الـ NAD(P)H بسهولة من خلال قياسات ضوئية عند أو قريب من 334، أو 340، أو 366 nm. إن هذه القياسات عادةً ما تُنفذ باستعمال ميكروليترات من العيّنة (مثل الدم). وعليه، فإنه بالإضافة لتقديم أنزيمات نقية للغاية، فإن تطوير ممصات (pipettes) عالية الدقة، وتجهيزات قياس بصرية وأدوات أخرى مناسبة لمثل هذه الأحجام الصغيرة (تقانة الميكروليتر (μ L))، هي حجر الأساس في في نشوء التقانة الأنزيمية.

طرائق التحديد (Methods of determination). وتضم بشكل أساسي ثلاثة إجراءات، (1) تحديدات نقطة النهاية (end-point determinations)، و(2) الطرائق الحركية (kinetic methods)، و(3) الطرائق التحفيزية (catalytic methods). ففي تحديدات نقطة النهاية، يتم قياس تحول المركب الأولي (substrate) أو العامل المساعد (cofactor) في التفاعل وذلك بعد انتهائه. والأمثلة على ذلك: تحديد الإيثانول (ethanol) بواسطة نازعة الهيدروجن من ـ ديهادرجيناز ـ الكحول (alcohol dehydrogenase)، أو تحديد اللاكتات (lactate) بواسطة نازعة الهيدروجين من ـ ديهادرجيناز ـ اللاكتات (lactate dehydrogenase). إن الوقت الذي تتطلبه طرائق نقطة النهاية هو عدة دقائق على الأقل: تزداد سرعة التفاعل مع ازدياد تركيز الأنزيم ومع قيم K_m منخفضة أو قيم V_{max} مرتفعة. وتضم الأمثلة على استخدام تفاعل مساعد (إضافي): تحديد الغلوكوز ذي الوضعية -D، (D-glucose) بواسطة الهيكسوكيناز (hexokinase)، التي يتبعها تشكل الـ NADPH في التفاعل المقترن والمحفَّز بأنزيم. أما عند استخدام الطريقة الحركية في نفس التفاعل هذا، فيمكن تحديد مستويات الغلوكوز بسرعة أكبر بكثير؛ إذ إن الطرائق الحركية لا تتطلب إكمال التفاعل حتى النهاية؛ بل تقاس سرعته الأوَّلية (initial velocity) التي تكون متناسبة خطياً مع الخطوة المحدِّدة لمعدل (rate-limiting step) السرعة، بشرط أن يكون معدل تركيز المركب الأولي منخفضاً ($< 10/1$ من قيمة K_m). كما يجب في مثل هذا النوع من المعايرات الحفاظ على شروط التفاعل وفواصل زمن القياس ثابتة تماماً. لذلك، تُعتبر الطرائق الحركية هي الطرائق المختارة للروبوتات المخبرية الطبية. وبالنسبة إلى الطرائق التحفيزية فإنها تؤمن حدود كشف أقل، حيث إن المادة التي يتم تحليلها هي التي تُستخدم (hydrolysed) كعامل مُحدِّد لمعدل السرعة في تفاعل حلقي متعدد الأنزيمات، ما يؤدي إلى استهلاك مستمر للعامل المساعد المتجدد. والمثال في هذا المجال: تحديد الأنزيم المساعد A، (co enzyme A) في تفاعلات مندمجة لأنزيمات الـ phosphotransacetylase، وأنزيم تنشؤ ـ سينثاز ـ السيترات (citrate synthase) ونازعة الهيدروجين من ـ ديهادرجيناز ـ المالات (malate).

التحضير والخصائص (Preparation and properties). تنتَج الأنزيمات التحليلية (analytical enzymes) بكميات قليلة، ولكن بنقاوة عالية. وهي غالباً ما تكون أنزيمات داخل خلوية (intracellular)، التي تكون موجودة بتراكيز قليلة بحيث يجب عزلها من الخلايا المحطمة بنوعية عالية وذات فعاليات جانبية ضئيلة أو حتى غير موجودة، وذلك عن طريق استخدام طرائق متنوعة جداً لتنقية الأنزيمات. أما اليوم فيسيطر استخدام الأنزيمات المأشوبة في هذا المجال، وذلك لإمكانية إنتاجها بسهولة وبكميات أكبر من دون فعاليات جانبية. كما يمكن تحسينها أكثر بغية تطبيق محددٍ من خلال الهندسة البروتينية. وبعيداً عن نوعية (تخصص) الأنزيم ونقاوته، تعتبر ثباتيته أيضاً أثناء النقل والتخزين من المسائل الأخرى الهامة. ففي العادة، يمكن قبول خسارة أقل من 20٪ من الفعالية في السنة على درجة حرارة 4°C. ولهذا، تضاف غالباً مواد مثبتة كالسكريات والغليسرول (glycerol) أثناء عملية الإنهاء.

أنزيمات التشخيص والتحليل

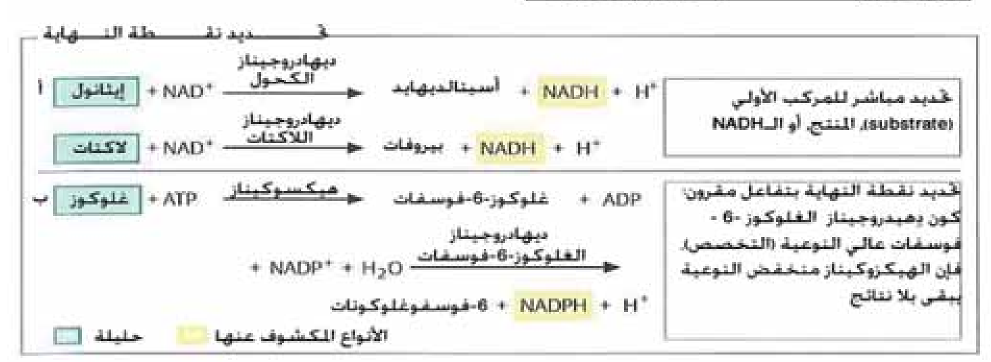
الأنزيم	رقم التصنيف الأنزيمي (EC number)	الحليلة (Analyte)	الحليلة المساعدة
دهيدروجيناز الكحول	1.1.1.1	إيثانول وكحولات أخرى، ألدهيدات	NADH
أوكسيداز الغلوكوز	1.1.3.4	غلوكوز	صبغة
كيناز البيروفات	2.7.1.40	فوسفوإينول بيروفات، ADP	
كيناز الكرياتين	3.5.3.3	كرياتين	
لاياز السيترات	4.1.2.6	حمض الليمون	NAD^+
إيزوميراز المانوز – 6– فوسفات	5.3.1.8	مانوز	
سينثاز السكسينيل-كو A (succinyl-CoA synthase)	6.2.1.4	سكسينات	

تحديد الـNADH

1,2 – 1,0 – 0,8 – 0,6 – 0,4 – 0,2 – 0
الامتصاص
NAD
NADH
0.315
260 300 340 400
طول الموجة (nm)

تحديد نقطة النهاية

تقنية القياس	حد الكشف
قياس ضوئي – تحديد نقطة النهاية – طرائق حركية – طرائق تحفيزية	1-10 µmolar 0.1-1 µmolar 1-10 nmolar
قياس الفلورة – تحديد نقطة النهاية – طرائق تحفيزية	1-10 nmolar 1-10 fmolar
قياس اللمعان	1-1000 pmolar



المعايرات الحركية

تحديد حركية الغلوكوز بالهيكزوكيناز ودهيدروجيناز الغلوكوز- 6-فوسفات: يتشكل الـ NADH بعد 10 ثواني في نظام مؤتمت

$\Delta A_{340nm}/10s$
0.6 – 0.4 – 0.2 – 0.0
0 20 40 60
غلوكوز (mmol/L)

V=Vmax x (S)/Km + (S)

معادلة ميكايليس-منتن (Michaelis-Menten): عند تراكيز للمركب الأولي << Km تكون سرعة التفاعل الأنزيمي متناسبة خطياً مع تركيز المركب الأولي

اعتماد مقدار جرعة الأنزيم على الـ K_m

الحليلة	الأنزيم	K_m (µmol/L)	V/K_m (1mL/min)*
ADP	كيناز الأسيتات	1600	1600
غلوكوز	هيكزوكيناز	100	100
غليسيرول	كيناز الغليسيرول	50	50
حمض البول	يوريكاز	17	17
فومارات	فوماراز	1.7	1.7

* محددة للشروط التالية: كلما ازدادت قيمة K_m ازدادت جرعة الأنزيم اللازمة، وذلك في حال توجب تحويل 99% من المركب الأولي خلال دقائق قليلة (يجب أن تكون V/K_m بدرجة 1mL/min)

• الاختبارات الأنزيمية (Enzymetic tests)

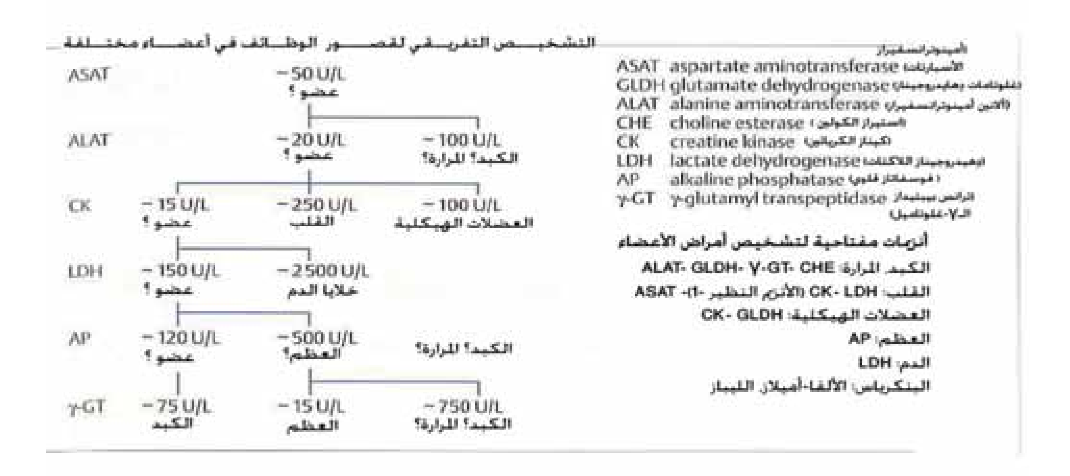
عموميات (General). منذ حوالى عام 1950، أحدث التحديد الأنزيمي للمستقلبات (metabolites) وقياس الفعاليات الأنزيمية (enzyme activities) في سوائل الجسم ثورة في التشخيص الطبي. وبعد ذلك بقليل، أصبحت المعايرات المناعية (immunoassays)، ومؤخراً معايرات الـ DNA، أدوات لا غنى عنها بالنسبة إلى الطبيب. ففي كواشف التشخيص الأنزيمي، يتم تحديد مركبات ذات وزن جزيئي صغير مثل حمض اللبن (lactic acid) والغلوكوز (glucose) في الدم أو في المصل من خلال أنزيمات مناسبة عالية الانتقائية (selectivity). كما أنه وكبديل عن ذلك، تستخدم تفاعلات مؤشرة مناسبة لتحديد تركيز الأنزيمات في مصل الدم وتشخيص عمليات مدمِّرة في أعضاء الإنسان. لقد دخلت الاختبارات الأنزيمية أيضاً في مجال تحليل الأغذية، وفي مراقبة عمليات التخمير وفي حماية البيئة. فباستخدام أنزيمات نازعات الهيدروجين (dehydrogenases)، يمكن استثمار تغير طيف امتصاص أو فلورة (fluorescence) الـ $NAD(P)^+$ و NAD(P)H (باختبارات بصرية). وهكذا، لدى استخدام أنزيم نازعة الهيدروجين ـ الديهادرجيناز ـ المناسب يمكن قياس الغلوكوز والإيثانول (ethanol) مباشرة، بينما يمكن تحديد مركبات عديدة أخرى كمياً، مثل الأحماض الدهنية (fatty acids) والغليسرول (glycerol)، بواسطة قرن تفاعلين أنزيميين مختلفين أو أكثر. ولأسباب عملية، من المفيد استخدام أقل ما يمكن من الأنزيمات المساعدة (الإضافية). أما في تحليل الأغذية، فهناك مجموعة من السكريات (غلوكوز، غالاكتوز (galactose)، مالتوز (maltose)) والأحماض (سيترات (citrates)، مالات (malate)) يتم تحديدها أنزيمياً؛ إذ إنه من المهم تحديد كمية الغلوكوز بشكل شبه مستمر في غالبية عمليات التخمير الميكروبي، وكذلك مراقبة مشابهة للغلوكوز واللاكتات (lactate) في مزارع الخلايا الحيوانية. إضافةً إلى ذلك، من الممكن أيضاً استخدام التثبيط الأنزيمي (enzyme inhibition) كأداة تحليلية: مثلاً، في قياس تثبيط الأستيل كولين استراز (acetylchiline asterase) المعزول، وهو أنزيم أساسي في النقل العصبي (neurotransmission) يمكن استخدامه للدلالة على وجود غازات أعصاب (nerve gases) أو فوسفات عضوي (organophosphate) أو مبيدات الحشرات الكارباماتية (carbamate pesticides).

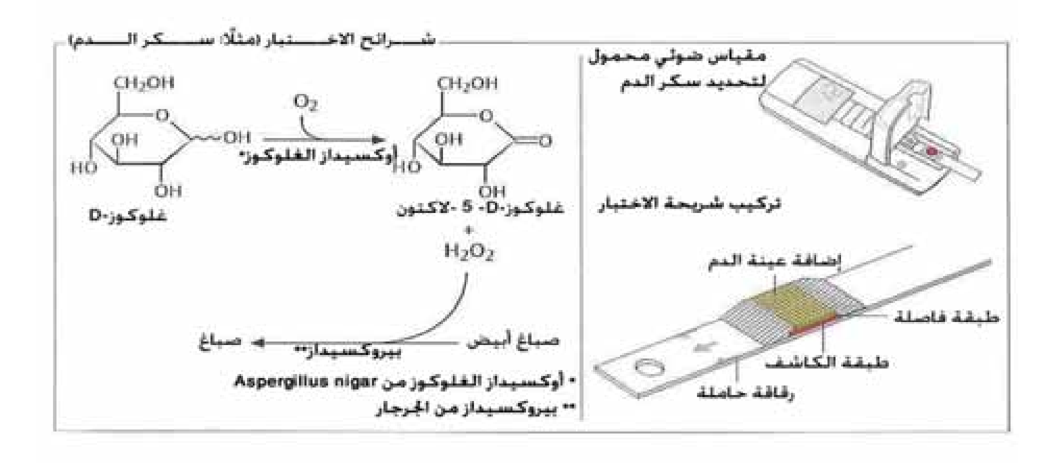
تحديد الفعاليات الأنزيمية (Determination of enzyme activities). يعتبر قياس الفعاليات الأنزيمية في مصل دم المريض وسيلة هامة بالنسبة إلى الطبيب. فعندما تتحطم الخلايا أثناء مرض ما (الذبحة القلبية، التهاب الكبد، تشمع الكبد، التهاب البنكرياس الخ...) تتحرر الأنزيمات في مجرى الدم. وعليه، يمكن رصد تحطم خلايا أعضاء مختلفة (القلب، العضلة، الكبد) وأجزائها (الأغشية، السيتوبلاسم، المتقدرة ـ الميتوكوندريا ـ) بقياس الفعالية الأنزيمية في الدم. كما يمكن تمييز نوعية (تخصص) العضو (تشخيص تفريقي)، حيث إن خلايا أعضاء مختلفة غالباً ما تحرر أنزيمات مختلفة أو أنواعاً فرعية أنزيمية مختلفة (أشكال مساوية (isoforms)). وهكذا، يمكن رصد أمراض الكبد بقياس أنزيمات الترانس أميناز (transaminases)؛ والتهاب البنكرياس بقياس الألفا أميلاز (α-amylase)؛ وتحطم خلايا عضلة القلب بالكرياتين كيناز (creatine kinase) («أنزيمات تشخيص أساسية»). إن تحديد هذه الأنزيمات يتبع نظاماً حركياً (kinetic regime) يقوم على استخدام المركبات الأولية التي لا تُظهر أي تفاعلية متصالبة (cross reaction) مع أنزيمات أخرى، أو تُظهِر القليل منها.

أتمتة المختبر. لقد كانت تُنفَّذ المعايرات الطبية الأنزيمية يدوياً باستخدام عينات فردية تم تحضيرها، ثم تطبيق إجراءات التحضين (incubation)، وبعد ذلك التحديد الكمي من خلال جهاز مقياس الطيف (spectrophotometer) البسيط ذي مراشح بأطوال موجية (wavelengths) مناسبة. أما الآن، فقد قاد التزايد الهائل في عدد الاختبارات الطبية الأنزيمية لأتمتة كاملة تقريباً في مختبرات التشخيص المركزية، حيث تتم كافة مراحل التوزيع بالماصات (Pipetting)، والتحضين والقياس بواسطة ربوتات مخبرية، والترميز بالخطوط (Barcodes) أو أية طرائق أخرى من أجل تعريف العينة.

شرائح الاختبار (Test strips). أحياناً، يمكن أن يعتبر الزمن اللازم لتنفيذ معايرة ما في مختبر التشخيص المركزي طويلاً بالنسبة إلى بعض حالات العناية (مثل، الفحص الذاتي اليومي الذي يقوم به مريض السكري، الفحوصات الإسعافية في غرف الطوارئ في المستشفيات). لذلك تستخدم غالباً في مثل هذه الأوضاع، شرائح اختبارات التشخيص. تتكون هذه الشرائح من عدة فواصل صلبة وطبقات تفاعل (ما يعرف بـ «الكيمياء الجافة») تُحضر فيها العيّنة حيث يتم الحصول على إشارة التفاعل بعد إضافة السائل (قطرة دم مثلاً). تستخدم في هذه الاختبارات غالباً أنزيمات الأوكسيداز (oxidases)؛ مع أنزيم بيروكسيداز (peroxidase) مساعد (إضافي)، لإعطاء ناتج التفاعل الأولي، وهو الماء الأكسيجيني (H_2O_2)، الذي يؤكسد الصباغ الأبيض (leuko dye) إلى مركب ملون، تتناسب كميته مع كمية المركب المراد قياسه في العيّنة. بعد ذلك، يمكن تحليل شرائح الاختبار بصورة شبه كمية من خلال المقارنة المرئية مع مخطط الألوان المتدرجة، أو بصورة كمية بواسطة مقياس ضوئي (photometer) لمعامل الانعكاس (reflectance).

الاختبارات الأنزيمية الشائعة (انتقاء)		
	المادة المحللة عادة	الصلة
التشخيص السريري	غلوكوز شحوم ثلاثية (ثلاثي الغليسيريد)، كوليستيرول حمض بول فوسفاتاز قلوي وحمضي ترانس أميناز كيناز الكرياتين	داء السكري دهون بالدم، خطر تصلب الشرايين النقرس الأورام أمراض الكبد احتشاء القلب
تحليل الأغذية	السكريات (غلوكوز، مالتوز) أحماض (سيترات، مالات)	النوعية النوعية، التقليد
ضبط العمليات الحيوية	غلوكوز، لاكتات	تخمير الميكروبات والمزارع الخلوية
مراقبة بيئية	مثبطات الأستيل كولين الاستراز	وجود الفوسفات العضوية، الكاربامات





الأنزيمات كإضافات (Enzymes as addetives)

عموميات (General). تستخدم الأنزيمات اليوم كإضافات في العديد من المجالات التقانية، مثل، المنظفات، والأغذية، وكذلك معالجة الورق والأقمشة والجلود. كما يتزايد استخدامها في المجال الصناعي لتصنيع الكيماويات الدقيقة كونها تتفوق على المحفزات الكيميائية (chemical catalysts)، في أغلب الأحيان، من حيث انتقائية الموقع (regioselectivity) والفراغية (stereoselectivity). ولنفس السبب، كثيراً ما تستخدم الأنزيمات في التحديد التحليلي (analytical determination) للعينات الطبية والمنتجات الغذائية. يتوفر اليوم العديد من الأنزيمات بشكلها المأشوب، ما يعني سعراً منخفضاً ونقاوة عالية وإمكانية تحسين خصائصها للاستخدام المرجو عبر تطبيق تقانات هندسة البروتين. إن أنزيمات الهيدرولاز (hydrolases) هي الأنزيمات المفضلة للاستخدام كإضافات كونها لا تتطلب إضافة عامل مساعد (cofactor).

الأغراض (Purposes) أو أهداف استخدام الأنزيمات كمضافات. إن استخدام أي أنزيم في مجال الصناعة يجب أن يكون مجدياً. وما تحسين نوعية المنتج، أو التوفير في كلف العمليات أو تحقيق الفوائد البيئية إلا أمثِلة نموذجية عمَّا أثبتته الأنزيمات المضافة في مجال الصناعة. فعلى سبيل المثال، تساهم أنزيمات البروتياز (protease) الموجودة في المنظفات في حل البقع البروتينية من داخل النسيج، وهو تأثير ما كانت الإضافات الكيميائية لتحدثه. كما يفوق التحليل (hydrolysis) الأنزيمي للنشاء التحليل الحمضي (acid hydrolysis) من حيث تشكل منتجات ثانوية غير مرغوبة. وباستخدام البيكتيناز (pectinase) في معالجة الفواكه، يزداد عطاء العصير المنتج بشكل ملموس، وتتناقص كلف عمليات الترشيح. إضافة إلى ذلك، تسمح أنزيمات البروتياز والكولاجيناز (collagenase) بإزالة انتقائية للشعر ومكونات جلدية أخرى أثناء معالجة الجلود، إذ حسّنت استخداماتها الأولى، منذ حوالى قرن تقريباً، ظروف عمل الدبّاغين بشكل كبير، بعد أن كانت مهنتهم منبوذة بسبب شروط العمل الكريهة السائدة. وإثر إضافة منفحة التجبين ـ مادة الرينين (Rennin) الميكروبية أو المأشوبة (recombinant) التي هي أقل كلفة بكثير وأكثر صحية من العملية التقليدية، التي كانت تعتمد على خلاصات من معد العجول، يتم تخثير الحليب. إن في غالبية هذه الحالات يجري استخدام مزائج أنزيمية لأسباب يتعلق جزء منها بالكلفة، وجزء آخر بالفائدة من وجود فعاليات جانبية ذات فوائد هامشية مرغوبة (مثلاً، بسبب وجود الألفا ـ أميلاز (α-amylase) المفكِّكة للنشاء إلى جانب بروتياز المنظفات). وبالنتيجة، فإن تحضير مثل هذه المزائج هو أبسط وأقل تطلباً من تحضير الأنزيمات التحليلية (analytical enzymes). إلا أنه من جهة أخرى، غالباً ما يكون توصيفها غير بسيط، وتكون مسألةً قياسية ـ معيارية ـ (standards) لدى المصنِّع. وعلى نحو مشابه، تصبح الفوائد التقنية أو الاقتصادية واضحة فقط عند استخدام طرائق تحديد محددة (نوعية) تتعلق بحرفة خاصة أو حتى بمصنِّع واحد؛ إذ يمكن أن يكون تطوير هذه الطرائق قد تم على فترة زمنية طويلة لا يمكن مقايستها (standardized) بسهولة، لأن رقابة النوعية الداخلية تظل لعقد، أو حتى لقرن، تعتمد على مقايسات ـ معايير ـ (standards) هذه الطرائق الفردية. نتيجة لذلك، قد لا تتطابق الاختبارات الكيميائية الحيوية المجراة في مختبر مصنِّع الأنزيم من أجل غربلة (Screening) الأنزيمات المحسنة، مع اختبار التطبيق المستخدم في الصناعة لدى الزبون، مما يجعل تحسين الأنزيمات كإضافات عملية مُمِلَّة.

التسجيل (Registration). يُنظم تصنيع الأنزيمات المستخدمة كإضافات بواسطة قواعد الـ GMP (الممارسة التصنيعية الجيدة). إن الأنزيمات المنتَجة بتقانات الهندسة الوراثية وهندسة البروتين تلعب دوراً أساسياً في المنظفات. بينما في قطاعات أصغر من السوق، مثل أنزيمات الغذاء، يعتبر استخدام الأنزيمات المأشوبة (recombinant) الاستثناء وليس القاعدة. فبالرغم من إمكانية وجود فائدة واضحة لاستخدام الأنزيم المأشوب، لكن التسجيل المكلف ومخاوف المستهلك الحقيقية أو المتوقعة يمكن أن تشكل حاجزاً أمام استخدامه لا يمكن تجاوزه، باستثناء حالات خاصة مثل حالة الكيموزين (chymosine) المأشوب.

تكاليف الإضافات الأنزيمية وأسواقها (Costs and markets). إن فائدة إضافة مستحضر أنزيمي تتعلق بدون شك بسعره. تترجم عادة الفائدة التقنية إلى ميزات اقتصادية يعبَّر عنها بالسنت (جزء من الدولار أو اليورو) لكل كيلوغرام منتج. وبالنتيجة، يقدر غالباً سعر الأنزيمات التقنية بحدود 3-10 €/kg. إلا أنه على الرغم من هذه المحدوديات، فإن السوق العالمية للأنزيمات التقنية قد نما عام 2001 حتى حوالى 1.6 بليون يورو، مع امتلاك أنزيمات الهيدرولاز (hydrolases) المستخدمة في المنظفات ثم أنزيمات الغذاء والأعلاف الحصة الأكبر منه.

الأنزيمات كإضافات في الصناعة

التطبيق	نوع الأنزيم	الكائنات الحية (أمثلة)	حجم السوق (% من المجموع العام)	الميزة الاقتصادية
منظفات	أنزيمات البروتياز ، السيلولاز ، الليباز	*Bacillus licheniformis, Aspergillus nidulans, Trichoderma reesei*	40	1
تحليل النشاء	ألفا أميلاز	*Bacillus amyloliquenifaciens*	5	3,4
مُصاوغة الغلوكوز	غلوكوز إيزوميراز	*Streptomyces venezuelae*	7	1,3
صناعة البيرة	أميلاز	*Bacillus subtilis*	3	3,4
معالجة الفواكه، النبيذ	سيلولاز ، هيميسيلولاز ، بيكتيناز	*Aspergillus oryzae*	5	3,4,5,6
الطحين، منتجات الخبز	ألفا أميلاز ، بروتياز	*Aspergillus oryzae*	8	1,3
صناعة الجبن، المنكهات	بروتياز ، كيموزين، ليباز	مادة الرينين الحيوانية، *Rhizomucor miehie, Saccharomyces cervisaiae*	12	2
السيلاج، علف الحيوانات	فايتاز (phytase)	*Aspergillus niger*	8	3
الورق والأنسجة	ألفا أميلاز ، ليباز	*Bacillus humicola*	2	4
معالجة الجلود	بروتياز	*Aspergillus oryzae*	10	1,7



العملية / التطبيق	كلفة الأنزيم لكل وحدة كمية (بالدولار الأمريكي)
تمييع النشاء	حوالي 2 دولار/طن النشاء
الغلوكوز من النشاء	3.5 دولار/طن النشاء
مُصاوغة الغلوكوز	6 دولار/طن النشا
الشرابات عالية المحتوى من الفركتوز (HFS) في الولايات المتحدة الأمريكية	6–7 دولار/طن النشاء
الإيثانول	1 دولار/طن النشاء
البيرة	0.1 دولار/100L
منتجات الخبز في الولايات المتحدة الأمريكية	0.1 دولار/100kg طحين
منتجات الخبز في الاتحاد الأوروبي	0.1–0.5 دولار/100kg طحين
عصير الفواكه	0.1–0.5 دولار/100L عصير
النبيذ	0.1–0.5 دولار/100L نبيذ
تثبيت عصير الليموناضة (عصير الليمون المحلى) بأوكسيداز الغلوكوز	0.3–0.8 دولار/1000L
صناعة الجبن	0.05 دولار/100L حليب
المنظفات	0.05 دولار/ kg منظف
دباغة الجلود	1.2–3 دولار/طن جلد

• أنزيمات المنظفات (Detergent enzymes)

عموميات (General). منذ قرن تقريباً، كان أوتو روهم (Otto Roehm) في ألمانيا أول من أدخل منظفات تحوي أنزيمات بنكرياسية لزيادة قوة إزالة البقع البروتينية كالدم، والبيض، والكاكاو وبقع الأعشاب. . . إلخ. وعندما باتت أنزيمات البروتياز (proteases) الميكروبية المأخوذة من سلالات الـ Bacillus متوفرة، حوالى عام 1960، بدأ استخدام الأنزيمات يتزايد بسرعة، وأصبح من النادر الآن وجود منظف بدون إضافات أنزيمية. لقد أدت عمليات تنسيل (كلونة) وهندسة البروتينات إلى تحسين أنزيمات البروتياز لتتكيف تماماً مع شروط الغسيل. تنتَج هذه الأنزيمات المأشوبة (recombinant) بكميات تفوق الـ 10000 طن بالسنة. كما تستخدم أنزيمات أخرى مثل السيلولاز (cellulose) واللايباز (lipase) والأميلاز (amylase) في المنظفات.

المنظفات وعملية الغسيل (Laundaring process). تحتوي منظفات الغسيل في العادة على مخفضات التوتر السطحي (surfactant) سلبية الشحنة الأيونية (anionic)، وعديمة الشحنة الأيونية (nonionic)، وأحياناً إيجابية الشحنة الأيونية (cationic). تُعطّل مخفضات التوتر السطحي سلبية الشحنة الأيونية بأيونات الكالسيوم والمغنزيوم الموجودة في المياه القاسية (hard water)، لذلك يجري إضافة عوامل معقِّدة على المنظفات لحجز هذه الأيونات. وعوضاً عن استخدام مركب فوسفات خماسي الصوديوم الثلاثي (pentasodium triphosphate)، الذي كان العامل المعقِّد الأكثر أهمية، يفضل حالياً استخدام سيليكات ألمنيوم الصوديوم (sodium aluminum silicate) بوجود كميات قليلة من «الحوامل» مثل حمض الليمون (citric acid) أو الفوسفونات (phosphanates). لقد كان هيبوكلوريت الصوديوم (sodium hypochlorite) أو ميتابورات بيرهيدرات الصوديوم (sodium metaborate perhydrate) من المبيضات الكيميائية التقليدية المستخدمة التي استبدلت غالباً ببيركاربونات الصوديوم (sodium percarbonate) أو بأحماض بيروكسي (peroxi-acids) العضوية متوسطة السلسلة. يقدر الرقم الهيدروجيني (pH) للمحلول المنظف بحوالى 10، ودرجة حرارة الغسيل بين 30-90ºC والزمن اللازم عادةً حوالى 30 دقيقة. وبالنتيجة، يجب أن تكون أنزيمات التنظيف ثابتة بشكلٍ كافٍ تجاه القلوية ووجود مخفضات التوتر السطحي، والعوامل المعقِّدة، والمبيّضات، إضافةً إلى وجوب انخفاض تخصصها (نوعيتها) بمركبها الأوّلي.

أنزيمات البروتياز (Protease). تستخدم حالياً وبشكلٍ حصري أنزيمات بروتياز السيرين (serine protease) المأخوذة من سلالات الـ Bacillus. لقد كان يجري تحسين السلالات والأنزيمات من خلال التطفير (Mutagenesis) وعمليات تحسين السلالة، إلا أن ذلك تم استبداله بتقانات الهندسة الوراثية وهندسة البروتينات. وبذلك تستخدم اليوم في الإنتاج سلالات الـ Bacillus التي أُدخل في صبغيتها جينة البروتياز. إن استخدام طرائق تصميم البروتينات، زاد من ثباتية أنزيمات البروتياز تجاه العوامل المعقِّدة والمؤكسِدة (oxidants). فعلى سبيل المثال، أدى استبدال الميثيونين 222، (methionine[222]) بالألانين (alanine) إلى الحصول على أنزيم ذي خصائص تسمح باستخدامه في غاسلات الصحون. وأثناء عملية التخمير، التي تكتمل بعد 72 ساعة أو أقل، يتم إنتاج البروتياز خلال فترة النمو (تعبير أساسي، بدون إضافة محرض). ثم بعد إزالة كتلة الخلايا بواسطة فواصل أو مراشح، يجري تركيز الأنزيم الخارج خلوي (extracellular) بالترسيب أو الترشيح الفائق (ultrafiltration) الذي يُتبع بتنقية جزئية. وبما أن استنشاق غبار أو حلالة (aerosol) الأنزيم في مكان العمل يمكن أن يؤدي لتفاعل أرجي (allergic reaction)، فإن الأنزيم المركز يعالَج ليحول إلى حبيبات (granules) مغشاة (encapsulated) وخالية من الغبار. لهذه الغاية يُبخ المحلول المركز على جسيم أساسي (core particle) ثم يُحبَّب بالمزج السريع مع إضافات مثل الأملاح والشموع والمثبتات، أو يُبخ مباشرة بوجود الإضافات في مجفف بخاخ (spray dryer) على الجسيم الأساسي. وكخطوة أخيرة، يتم تغليف كل نوع من الأنزيمات بشمع وملوِّن، في حين بينت دراسات مختلفة واسعة النطاق، عدم حدوث أرجيات (allergies) من خلال استنشاق مثل هذه المنتجات أو التعرض لها عن طريق الجلد.

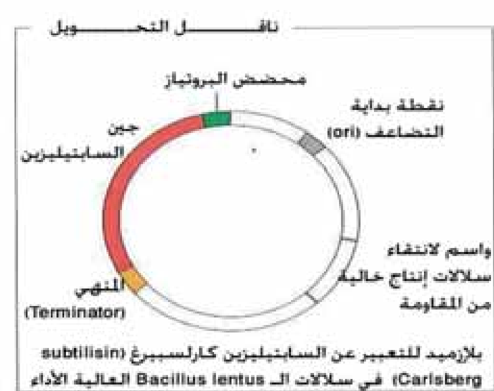
أنزيمات السيلولاز (Cellulases). تملك أنزيمات السيلولاز الداخلية قدرة تحليل مائية (hydrolysis) بدرجة رقم هيدروجيني (pH) فضلى أثناء غسل القطن، وهو تلك الأنسجة السيلولوزية الدقيقة الناتئة من القماش. ونتيجة لذلك، يبدو النسيج المغسول أنعم وأكثر نصاعاً، كما يصبح مقاوماً لأصبغة التربة بشكل أفضل من الأنسجة العادية. حالياً، تستخدم بشكل أساسي أنزيمات سيلولاز مأخوذة من *Humicola insulans* ومن أنواع من بكتيريا *Bacillus*.

الليباز (Lpases). تملك أنزيمات الليباز درجة رقم هيدروجيني (pH) قلوية فضلى لإزالة البقع الدهنية (مثل زيت الزيتون) أو استرات (esters) الشمع (مثل أصبغة أحمر الشفاه) التي يصعب إزالتها بمخفضات التوتر السطحي الكيميائية. إن أنزيمات الليباز الأكثر أهمية والمستخدمة حالياً في المنظفات هي مأخوذة من أنواع *Thermomyces* والمحضرة في سلالات من *Aspergillus oryzae* المأشوب.

أنزيمات الأميلز (amylases). تُفكِّك أنزيمات الأميلاز البقع التي تحتوي على النشاء من خلال التحلل المائي (hydrolysis). لهذه الغاية تم اقتراح أنزيمات أميلاز قلوية ومتحملة للحرارة (thermo-tolerant).

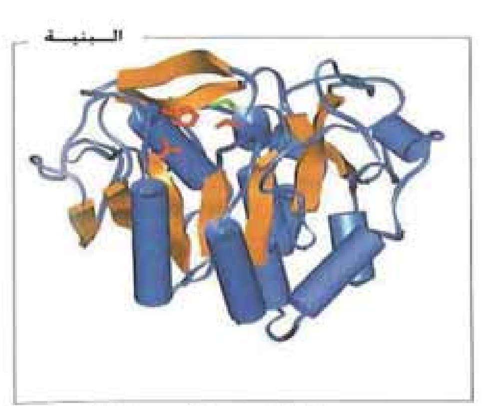
ثباتية أنواع مختلفة من البروتياز كأنزيمات منظفة				
نوع البروتياز	سيرين(serine)	سيستيين (cysteine)	كاربوكسي (carboxy)	معدني
مثال	السابتيليزين (subtilisin)	البابابن(papain)	الببسين (pepsin)	الثيرمولايزين (thermolysin)
الفعالية عند pH-10	+	−	−	−
الثباتية عند pH-10	(+)	−	−	−
الثباتية على درجة 50°C	+	−	−	+
الثباتية تجاه العوامل المعقّدة	+	+	+	−
الثباتية تجاه العوامل المؤكسدة	+	−	+	+
الثباتية تجاه مخفضات التوتر السطحي	−	−	−	−

ناقـــــل التحــــــويل



بلازميد للتعبير عن السابتيليزين كارلسبيرغ (subtilisin Carlsberg) في سلالات الـ Bacillus lentus العالية الأداء

الـبـنيـة



التخمـــير والاســـــترجاع

المزرعة التحضيرية
سلالة عالية الأداء معدلة وراثياً من Bacillus lentus:
10 متر مكعب، 24 ساعة عند 35 درجة مئوية

المفاعل الحيوي
120 متر مكعب، 48 ساعة عند 35 درجة مئوية، مصدر الكربون: الديكستران؛ مصدر النيتروجين: دقيق الصوية التحريض بالكازينين

< 15g/L سابتيليزين خلال 60 ساعة

فصل الخلايا والتركيز
ترشيح دقيق وترشيح فائق أو ترشيح بالجريان التصالبي ترسيب

[2] مزيج حبيبات
جسيم أساسي (ملح/PEG) مشكّل للتحبيب في المازج، بعد التجفيف يُغلّف بـ PEG/TiO2 في مجفف رذاذ

[1] طبقات حبيبات
جسيم أساسي (ملح مغلف/ سكر حبيبي)، كانسات جذرية، بولي ايثيلين غلايكول(PEG)، أوكسيد التيتانيوم(TiO2)، تغليف على طبقات في مجفف رذاذ



● أنزيمات التحليل المائي للنشاء

(Enzeymes for starch hydrolysis)

عموميات (General). النشاء هو ثاني أهم متعدد ساكاريد (polysaccharide) (بعد السيلولوز (cellulose)) ينتج على الكرة الأرضية. وهو أهم مصدر كربون بعد الغلوكوز في عمليات التخمير. في عام 1995 أنتج حوالى 20 مليون طن من النشاء؛ 70٪ منها منتجة من الذرة، و20٪ من البطاطا. هناك 20٪ فقط من النشاء المعزول يستخدم مباشرة؛ و30٪ يُعدَّل كيميائياً، و50٪ يحوَّل لسكر (saccharified) لإعطاء الغلوكوز أو قليلات الوحدات منه (oligomers) المعروفة بالديكسترين (dextrins). تتمثل الطريقة المفضلة لتحليل (hydrolysis) النشاء بالطريقة الأنزيمية التي تؤدي إلى تفاعلات جانبية أقل من طريقة التحليل الحمضي (acid hydrolysis).

النشاء (Starch). هو عبارة عن بوليمر (polymer) بدرجة بلمرة 200-5000 dp تعادل (degree of polymerization ومكون من أميلوز خطي (lineare amylose) (متعدد ألفا ـ 1، 4 ـ D ـ غلوكوز (poly-α-1)، (4-D-glucose) وأميلوبكتين (amylopectin) متفرع. والأميلوز زائف البلورة (pseudocrystalline)، تُحدَّد كميته في النشاء بتفاعل اليود مع النشاء. أما الأميلوبكتين، فتتفرع سلسلة الأميلوز الخطية فيه كل 20 ثمالة غلوكوز تقريباً على نحو إضافة ثمالة غلوكوز ذات وضعية D برابطة 6، (D-1)، 6-glycosidation). تختلف نسبة الأميلوز إلى الأميلوبكتين تبعاً لمصدر النشاء؛ وهي التي تحدد خصائص النشاء الفيزيائية والكيميائية. إن النشاء غير منحل في الماء البارد، لكنه عند التسخين فإنه ينحل إلى أن تتحطم جسور الهيدروجين بين الجزيئات (intrmolecular hydrogen bridges). وبالنسبة إلى الهلمنة (gelatinizatin)، فيشكل النشاء هلاماً من خلال إدمصاص الماء ما ينتهي إلى زيادة كبيرة في اللزوجة، بحيث يمكن تعديله كيميائياً أو تفكيكه أنزيمياً في حالته هذه. بينما إذا تم تبريد النشاء المهلم فإن الأميلوز يعود إلى التبلور من جديد بسرعة مع تشكل روابط هيدروجين بين الجزيئات (تسلسل تراجعي (retrogradation)). إن النشاء هو مكون هام أو مادة خام للعديد من المواد الغذائية الأساسية مثل الخبز والبيرة. وقد تم استبدال إجراءات تحضيره التقليدية أكثر فأكثر ببروتوكولات محسَّنة تلعب فيها العمليات الأنزيمية دوراً هاماً.

الأنزيمات المفكِّكة للنشاء (Starch degrading enzymes). هناك عدة أنزيمات قادرة على تفكيك النشاء: يحلل أنزيم الألفا ـ أميلاز (β-amylase) (الاسم المرادف: exo-amylase) النشاء بالمواضع α ـ 1، 4 داخل سلسلة البوليمر؛ ويحلل أنزيم البيتا ـ أميلاز) (الاسم المرادف: endo-amylase) المالتوز (maltose) أو المالتوترايوز (maltotriose) من النهاية غير المختزلة؛ ويشطر أنزيم الغلوكوأميلاز (glucoamylase) (الاسم المرادف: غاما ـ أميلاز (γ-amylase)، أميلوغلوكوزيداز (amyloglucosidase)) المالتوز (maltose) إلى ثمالتين من الغلوكوز، ولكن إذا خُفِّضت السرعة، فإنه يحلل أيضاً روابط α ـ 1، 6 من الأميلوبكتين؛ وتشطر أنزيمات البولولاناز (pullulanases) الروابط α ـ 1، 6 للبولولان (pollulan) تفضيلياً والأميلوبكتين أيضاً، وكذلك تشطر أنزيمات الإيزوأميلاز (isoamylase) الروابط α ـ 1، 6، ولكن بسرعة أكبر مع الأميلوبكتين منها مع البولولان.

أنزيمات الألفا ـ أميلاز (β-amylases). يوجد هذا الأنزيم الأسبارتيلي (aspartyl enzyme) في العديد من الكائنات الحية. وقد جرت بلورته (crystallization) بعد استخلاصه من الشعير المنبت (Malt)، والبنكرياس، والـ *Aspergillus oryzae*. كما تم الحصول على البنية البلورية لأنزيم الألفا ـ أميلاز المأخوذ من *Bacillus subtilis*. بالإضافة إلى تنسيل (كلونة) العديد من أنزيمات الألفا ـ أميلاز هذه والتعبير عنها بإفراط في نظم مضيفة متنوعة. إن أنزيمات الألفا ـ أميلاز البكتيرية تُظهر تحملاً لدرجات حرارة أعلى (من *Bacillus liqueniformis*: يعمل بدرجة 78ºC) وهي أيضاً أكثر ثباتاً تجاه القلوية من أزيمات الأميلاز الفطرية. وبذلك، تتوفر مجموعة كبيرة من أنزيمات الألفا ـ أميلاز المتحملة لدرجات من الرقم الهيدروجيني (pH) ودرجات الحرارة المختلفة تبعاً للتطبيق المرغوب.

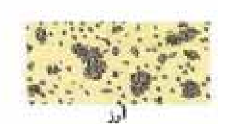
أنزيمات البيتا ـ أميلاز (β-amylases) وهو أنزيم سلفهيدريلي (sulfhydryl) يُنتَج من نقيع القمح (wheat malt) ومن *Bacillus staerothermophilus* أيضاً. كما أنه أنزيم هام في تحضير شرابات المالتوز (maltose syrups).

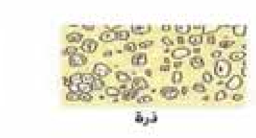
أنزيمات الأميلاز المشطرة لروابط α ـ 6 ,1 (amylases 1, 6 ـ α splitting α -1,6 -bonds). إن الأنزيم الأهم في هذه المجموعة هو أنزيم الغلوكوأميلاز (glucomylase) المأخوذ من *Aspergillus niger*. كما يستخدم أنزيم مشابه مأخوذ من أنواع ريزوبوس *Rizopus*. وهناك أيضاً أنزيم البولولاناز (pullanase) الذي يُنتج صناعياً من المضيف *Klebsiella pneumoniae* و*Bacillus cereus*.

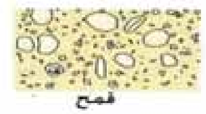
إجراءات التصنيع (Manufacturing procedures). ما زالت بعض الأنزيمات المذكورة أعلاه تُنتَج بالطرق التقليدية من التخمير السطحي (surface fermentation). إلا أنه تم استبدال هذه الطريقة تدريجياً بالمفاعلات الحيوية المهواة (aerated bioreactors) ذات حجم يصل حتى $120m^3$. في هذه العملية يتم إفراز الأنزيمات في وسط الزرع ما يعطي محلولاً أنزيمياً مخففاً بعد إزالة كتلة الخلايا. وكون قيمة هذا المنتج الأنزيمي منخفضة نسبياً، فإن عمليات العزل تتضمن فقط خطوات قليلة وبسيطة كالترشيح الفائق والترسيب، انتهاءاً بإضافات للتثبيت (stabilizing additives).

مصدر النشاء	الأميلوز (%)	الأميلوبكتين (%)	مدى الجلتنة (°C)	القدرة على الانتفاخ (مرة)
البطاطا	23–18	82–77	66–56	1000<
القمح	25–19	81–75	63–52	21
الذرة	30–21	79–70	72–62	24
الأرز	19–17	83–81	78–61	19

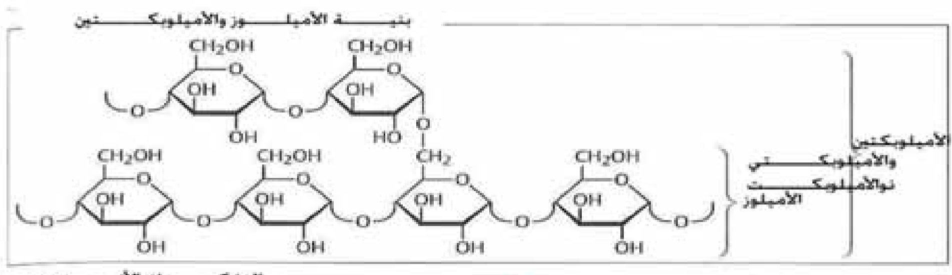
تركيب أنواع مختلفة من النشاء وخصائصها


أرز


ذرة



قمح


بطاطا



التفكـــيك الأنـــزيمي

glu – glu – glu – glu – glu – glu – glu – glu – glu – glu – glu

الأميلوز

glu – glu – glu – glu – glu

glu – glu – glu – glu – glu

glu – glu – glu – glu – glu – glu – glu – glu

الأميلوبكتين

glu – glu – glu –

– glu – glu – glu –

– glu – glu – glu –

البولولان(pullulan)

glu – glu المالتوز

glu – glu – glu المالتوتايوز

α-أميلاز (1،4-α- D -غلوكان-4-غلوكانوهيدرولاز EC 3.2.1.1) يشطر روابط المالتوز والمالتوترايوز α-1،4.

β-أميلاز (1،4-α- D-غلوكان-غالتوهيدرولاز EC 3.2.1.2) يشطر وحدات المالتوز من النهايات غير مُختَزِلة.

غلوكوأميلاز (γ-أميلاز (1،4-α- D -غلوكان-غلوكوهايدرولاز EC 3.2.1.3) وبولولاناز (أميلوبكتين-6-غلوكانوهايدرولاز EC 3.2.1.41)؛ يشطر الروابط α-1،6.

مزيج من α-أميلاز و غلوكوأميلاز/ بولولاناز: يشطر الأميلوز والأميلوبكتين إلى غلوكوز-D.

glu = ذو نهاية غير مُختَزِلة

الأنزيمات

أنزيم	الأصل	الخصائص	شروط التطبيق
α–أميلاز	*Bacillus liqueniformis*	أفضل تأثير لدى 60°C، 5.7=pH، تتطلب Ca^{+2}	95-105°C، Ca^{+2}، pH=7-6
	oryzae Aspergillus	أفضل تأثير لدى 50-60°C، pH =5.0، تتطلب Ca^{+2}	>50°C، Ca^{+2}، pH<3.5
	ملت الشعير	أفضل تأثير لدى 70°C، 5.5=pH	>70°C، pH<4.5
β–أميلاز	*Bacillus staerothermophillus*	أفضل ثباتية لدى 75°C، 5.0=pH	لشرابات المالتوز
بولولاناز	*Pneumoniae Klebsiella*	أفضل تأثير لدى 50-55°C، pH =5.0	55-60°C، pH=3.5–5.0
غلوكوأميلاز	*Rizopus* وأنواع *Aspergillus niger*	أفضل ثباتية لدى 55-60°C، pH =4.0	55-60°C، pH=3.5–5.0

• التحليل الأنزيمي للنشاء (Enzymetic starch hydrolysis)

عموميات (General). يتم تحليل حوالى نصف النشاء المعزول سنوياً (حوالى 20 مليون طن/ السنة) بالطريقة الأنزيمية. ويستخدم حوالى 6 مليون طن في صناعة الأيزوغلوكوز (isoglucose) (أو الشراب عالي المحتوى من الفركتوز (HFS)). أما الباقي فيُحَلّل جزئياً إلى ديكسترينات وشرابات مالتوز مستخدمة في مجال واسع من التطبيقات، مثل، استخدامها كمصدر كربون في عمليات التخمير. إن القمح والذرة غالباً ما يستخدمان كمواد خام لإنتاج النشاء في الولايات المتحدة الأمريكية. أما نشاء البطاطا والأرز فهو أقل أهمية من الناحية العملية كمواد خام، وذلك لأنهما يزرعان بكثافة في أوروبا وآسيا ولايمكنهما المنافسة في السعر. عندما منع نابليون دخول البضائع البريطانية إلى أوروبا (الحصار القاري)، بدأ إنتاج السكر في أوروبا من ساكاروز الشمندر السكري عن طريق التحليل بأحماض معدنية. وقد أعطت هذه التقانة منتجات ثانوية ملونة وهي اليوم طريقة غير جذابة.

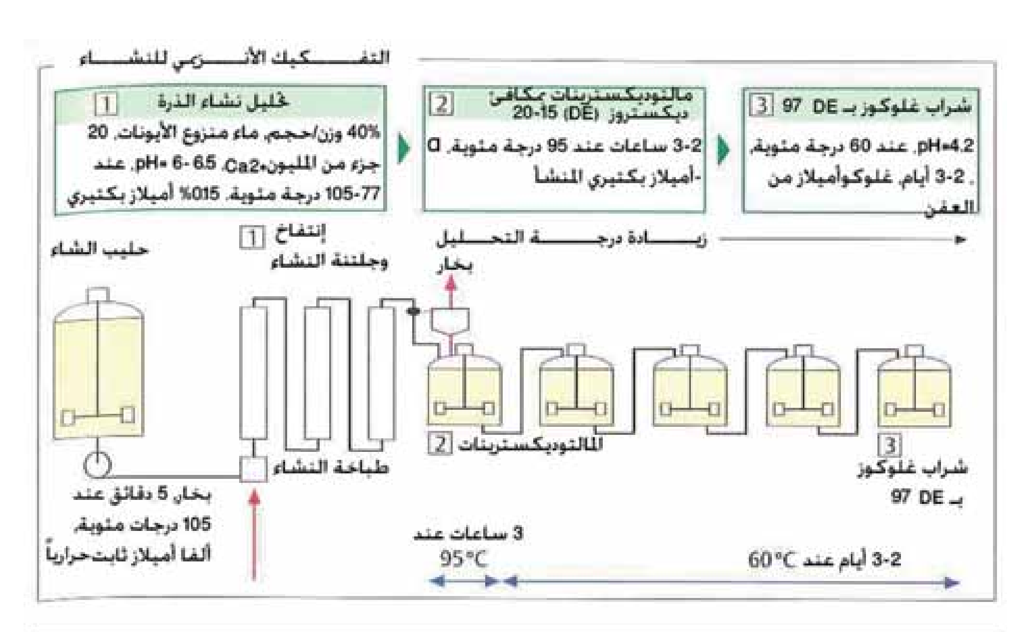
التحليل الأنزيمي للنشاء (Enzymetic starch hydrolysis). يتم الحصول على النشاء من الذرة أو القمح بالطحن الرطب، ما ينتج من ذلك منتجات ثانوية عالية القيمة، منها: زيت بذر الذرة، غلوتين الذرة والقمح، وإضافات علفية مختلفة التركيب. بعد ذلك، يُسخَّن النشاء المطحون لعدة دقائق فقط، بوجود الأنزيم البكتيري ألفا ـ أميلاز (α-amylase) الثابت بالحرارة، إلى درجة حرارة تتراوح بين 105-140ºC (طبخ النشاء) حتى انتفاخ النشاء وتحوله إلى هلام (gelatinaized). ثم بعد 2 ـ 3 ساعات وبوجود أنزيم الألفا ـ أميلاز المأخوذ من بكتيريا *Bacillus* يكتمل التحويل الحيوي إلى المالتوديكسترين (ذو مكافئ من الديكستروز[2] بقيمة 15-20 DE)؛ الذي هو عبارة عن مزيج من قليلات الساكاريد (oligosaccharides) مع كميات زهيدة من ساكاريدات أحادية وثنائية وثلاثية. وهو مادة بادئة (starting material) ممتازة للتأكد من تحويل الكربوهيدرات إلى سكر (Saccharification) بشكل كامل. وتستخدم المالتوديكسرينات أيضاً كمكونات غذائية قليلة التحلية، في أغذية الأطفال مثلاً، وفي الوجبات الغذائية في المستشفيات، وفي الحساء السريع التحضير.

التحويل الأنزيمي للكربوهيدرات إلى سكريات (Enzymetic saccarification). يمكن أن توجَّه عمليات التحويل الأنزيمي للكربوهيدرات إلى سكريات لإنتاج الديكستروز، والغلوكوز، والمالتوز العالي (high-maltose)، أو الشرابات عالية التحول. في هذه العملية، تمثل مزائج الألفا ـ أميلاز (α-amylase) البكتيرية والغلوكوأميلاز (glucoamylase) المأخوذ من *Aspergillus niger* أنزيماتٍ أساسية. في البداية، يتم تبريد المالتوديكسترين الناتج من طبخ النشاء إلى حوالى 60ºC، ويُضبط الرقم الهيدروجيني (pH) عند القيمة 4 تقريباً، كما يكون النمط المستمر هو النمط المستخدم في العادة، مما يتطلب عدة أحواض متتالية لتجنب مزج الشرابات ذات الدرجات المختلفة من التحليل المائي (hydrolysis). وبعد 48 ـ 72 ساعة ينتج من هذه الإجراءات شراب غلوكوز ذي قيمة مرتفعة جداً من مكافئ الديكستروز (Dextrose Equivalent) (97-98 DE). ثم لدى إضافة البولولانيز (pullulanase) أو الإيزوأميلاز (isoamylase) فإن ذلك يؤدي للحصول على قيم مكافئ ديكستروز أعلى وانخفاض في مستويات الغلوكوأميلاز (glucoamylase). لقد تم إثبات أن استخدام الأنزيمات المثبتة (immobilized enzymes) ليس مهماً، وذلك بسبب الانتشار المحدود في محلول المركب الأولي اللزج وتشكل منتجات قابلة للارتداد إلى الأصل. تُستخدم الشرابات ذات قيم مرتفعة جداً لمكافئ الديكستروز في عزل الغلوكوز ذي الوضعية D الوحيد الماء (D-glucose monohydrate) بصورةٍ نقية (أو هيدرات الديكستروز (dextrose hydrate)) عن طريق البلورة. كما يمكن تفصيل تركيبات مختلفة لخيارات واسعة من شرابات الغلوكوز بانتقاء أنزيمات وشروط عمليات التحويل إلى سكر بشكل مناسب. أما شرابات الغلوكوز ذات مكافئ الديكستروز المنخفض أو المتوسط نسبياً فتستخدم في صناعة الحلويات. وبالنسبة إلى إنتاج المالتوز العالي والشرابات عالية التحول من المالتوديكسترين، اللذين يتصفان بلزوجة عالية ولكن بميل منخفض لإعطاء لون بني أو لتشكيل بلورات، فإنه غالباً ما يُستخدم أنزيم الألفا ـ أميلاز المأخوذ من *Aspergillus niger*.

الديكسترينات الحلقية (Cyclodextrins). إذا تمت معالجة المالتوديكسترينات بأنزيم ترانسفيريز الديكسترين الحلقي (cyclodextrin transferase)، فإن حلقات الديكسترين الحلقية المؤلفة من 5 أو 6 أو 7 عناصر تتشكل. تُظهر هذه الحلقات انحلالية جيدة في الماء، لكنها تحتوي أيضاً على تجاويف كارهة للماء (hydrophobic cavities) بقطر 0.5-0.75 nm، التي تكون مناسبة لاستضافة جزيئات كارهة للماء مثل الفيتامينات أو المعطرات أو الأدوية. وبالتالي، تستخدم الديكسترينات الحلقية لتعزيز انحلالية مثل هذه المركبات وتحسين ثباتها في بعض المستحضرات. أما مشتقات الديكسترين الحلقية المنعدمة التناظر المرآتي فتُستخدم كأطوار ثابتة في فصل مزائج المركبات المنعدمة التناظر المرآتي. ينحصر غالباً الإنتاج الصناعي للديكسترين الحلقي بإنتاج الشكل بيتا منه)، وتتم عملية إنتاجه باستخدام أنزيمات ترانسفيراز الديكسترين المناسبة، المعزولة من الـ *Bacilli* المحبة لدرجات حرارة معتدلة (mesophilic) والمحبة للقلوية (alkalophilic)، والنشاء أو الديكسترين كمواد بادئة.

---

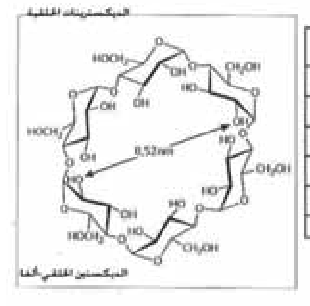
(2) المكافئ من الديكستروز: قياس لدرجة حلمهة النشا



منتجات تحليل النشاء أنزيمياً

المنتج	الخصائص (المكافئ من الديكستروز)*	الأنزيم المستخدم	التطبيقات
المالتوديكسترينات	25-15	α-أميلاز	إضافات غذائية بخصائص انسيابية جيدة؛ مواد أولية للمحليات
شرابات المالتوز	45-40	α-أميلاز ، β-أميلاز	محليات
مالتوز عالي	55-50	α-أميلاز ، غلوكوأميلاز	المحليات
شرابات مالتوز بدرجات تحول إلى سكر مرتفعة أو مرتفعة بشكل زائد	70-60 80<	α-أميلاز ، غلوكوأميلاز ، بولولاناز	محليات مواد أولية للتخمير
ديكستروز	97	تحليل مطول	مواد أولية للغلوكوز النظير
الغلوكوز النظير	97	إيزوميراز الغلوكوز	المحليات

* المكافئ من الديكستروز : قياس لدرجة تحليل النشاء



الخصائص

ديكسترينات الحلقية	α	β	γ
عدد ثمالات الغلوكوز	6	7	8
الوزن الجزيئي	972	1135	1297
الانحلالية في الماء (100g/mL)	14.5	1.85	23.2
القطر (nm)	0.47≤	0.6≤	0.75≤
CAS	10016-20-3	7585-39-9	17465-86-0

• الأنزيمات والمُحليّات (Enzymes and sweeteners)

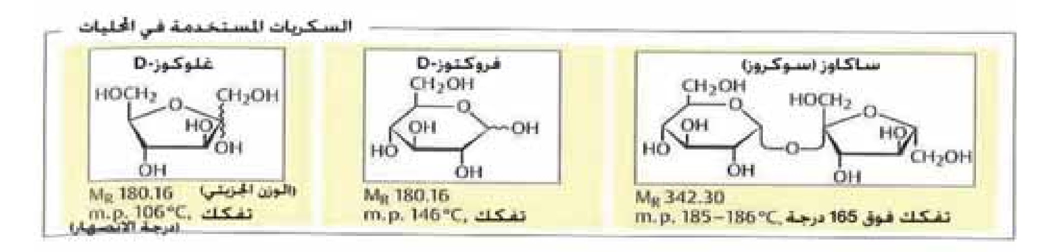
عموميات (General). لقد أصبح السكر (الساكاروز -D (D-saccharose)، والسكروز (sucrose)) إضافة غذائية هامة في الثقافة الغربية اعتباراً من القرن الثامن عشر. في البداية، كان قصب السكر، النامي في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية، المصدر الذي يتم عزل سكر الطعام منه. ونتيجةً لحصار نابليون للقارة الأوربية، تم تطوير تقانات جديدة تسمح بإنتاج السكر من الشمندر السكري. أما اليوم فقد أصبح نشاء الذرة والقمح من المواد الخام الهامة جداً في إنتاج السكر بعمليتين أنزيميتين: تحليل (hydrolysis) النشاء أولاً إلى غلوكوز، ثم مصاوغة الغلوكوز لإعطاء شرابات غلوكوز ـ فركتوز (glucose-fructose (أو أيزوغلوكوز (isoglucose)). ولاعتبارات تتعلق بالحمية الغذائية (تخفيض امتصاص السعرات الحرارية وتجنب السمنة)، تم تطوير عدة بدائل من السكر، حيث يتم انتاج بعضها بتقانة الأنزيمات. في النهاية، تُقيَّم درجة حلاوة السكر أو بدائل السكر حسياً من خلال لجنة مختصة وذلك مقارنةً بمحلول 10٪ من الساكاروز المائي.

السكر المنقلب (Invert sugar). يتم تحليل (hydrolyse) الساكاروز (saccharose) بالحمض أو بواسطة أنزيم الإنفرتاز (Invertase) إلى شراب سكر منقلب، الذي هو عبارة عن مزيج متعادل مولياً (equimolar) من الغلوكوز -D، (D-glucose) والفروكتوز -D، (D-fructose). إن حلاوة السكر المنقلب هي شبيهة بحلاوة الساكاروز، وبما أنه (السكر المنقلب) لا يتبلور (crystallize)، فإنه يستخدم غالباً في صناعة السكاكر وحشوات الشوكولاته الطرية. يتم الحصول على أنزيم الأنفرتاز من كتلة خلايا خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae*، بحيث يكون موجوداً في السيتوبلازم (cytoplasma)، ويمكن الحصول عليه بشكل نقي بعدد قليل من خطوات المعالجة اللاحقة، بعد كسر الجدار الخلوي بالطحن بواسطة كريات. يُنتَج السكر المنقلب في مفاعل أنزيمي بوجود الإنفارتاز المثبت (immobilized)، وباستخدام شراب الساكاروز 70٪ كمادة بادئة (starting material)، كما تسمح ثباتية الأنزيم باستخدام المفاعل على نحوٍ مستمر لعدة أيام على درجة 55ºC.

الأيزوغلوكوز (Isoglucose). يحوِّل أنزيم مصاوغ الغلوكوز (glucose isomerase)، المعزول من الـ Streptomyces وسلالات أخرى، الغلوكوز -D (D-glucose) في تفاعل متوازن إلى فروكتوز -D، (D-fructose). وعلى درجة حرارة التفاعل المفضلة التي تبلغ 60ºC، يتشكل مزيج من 42٪ فروكتوز -D و55٪ غلوكوز -D (أيزوغلوكوز، شراب عالي المحتوى من الفركتوز (high-fructose syrup (HFS))، الذي هو أقل حلاوة بقليل من الساكاروز. أما إذا تم فصل الغلوكوز من هذا المزيج بالكروماتوغرافيا (chromatography) وجرت إعادة مصاوغته (re-isomerization)، فإنه يمكن الحصول على الإيزوغلوكوز 55، المحتوي على 55٪ فروكتوز -D، الذي أثبت أفضليةً في صناعة المشروبات الخفيفة من خلال زيادة حلاوته. يبلغ الإنتاج السنوي من الأيزوغلوكوز 42 و55 حوالى 3.5 و4.5 مليون طن على التوالي، في حين تُنتِج أمريكا الشمالية 80٪ منها. إلا أنه بسبب تشريعات الاتحاد الأوروبي التي تحمي مزارعي الشمندر السكري، تُنتِج دول الاتحاد الأوروبي حوالى 300000 طن فقط من الأيزوغلوكوز.

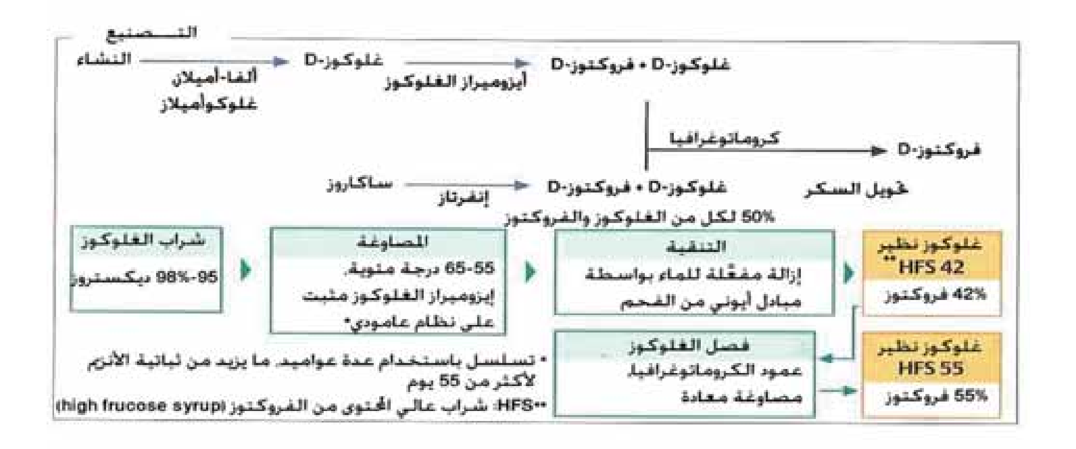
التصنيع (Manufacture). يوجد أنزيم مصاوغ الغلوكوز (glucose isomerase) الداخل خلوي (intracellular) في عدة كائنات مجهرية. هذا البروتين هو ثنائي الأجزاء المتجانسة (homodimer) ويضم معادن ثنائية التكافؤ (bivalent)، مثل Mn^{+2} أو Co^{+2} التي تساهم في التحفيز (catalysis). ينتج سنوياً حوالى 1500 طن من هذا الأنزيم، غالبيتها من سلالات الـ Streptomyces أو *Bacillus coagulans*، وعادةً في مفاعل حيوي بطريقة الدفعة المغذاة (fed-batch process) (على دفعات) لمدة 72 ساعة. لتجنب كلفة عزل الأنزيم من داخل الخلية، يُصنَّع غالباً الأيزوغلوكوز (isoglucose) مباشرة باستخدام سلالة ميكروبية مثبتة (immobilized)، وذلك عن طريق تعطيلها (inactivation)، وتشبيكها بالغلوتارألدهيد (glutarylaldehyde)، ثم ربطها بمادة حاملة (carrier) مناسبة. تصل تراكيز المركب الأولي (substrate) والمنتج إلى نقطة التوازن (equilibrium) خلال ساعة واحدة من التماس بين الكائن المجهري المثبت والغلوكوز المضاف؛ حيث يتشكل عند درجة حرارة 60ºC حوالى 42٪ من الفروكتوز -D، معطياً أيزوغلوكوز 42. وبهذه الشروط، يبلغ زمن نصف العمر (half-life) للمحفز حوالى 5 0 يوماً. لذا من الممكن تشغيل هذه العملية بشكل مستمر إذا تم استخدام خط انتاج منظم. وبسبب أمثلة السلالات، لم تعد العمليات الحديثة تعتمد على إضافة الأيونات من Mn^{+2} أو Co^{+2} كعوامل مساعدة (cofactors). في النهاية يكون منتج التفاعل محتوياً على آثار من السكريات المرهمية (caramelized) التي تتم إزالتها بالتمرير على عواميد من الفحم (charcoal). وبعدها يسوَّق الأيزوغلوكوز على شكل شراب.

الفروكتوز -D، (D-fructose). وهو عبارة عن سكر عالي التحلية، يمكن تحضيره من السكر المنقلب (invert sugar) أو من الأيزوغلوكوز (isoglucose) بواسطة الكروماتوغرافيا، عادةً تلك التي تحاكي كروماتوغرافيا القعر المتحرك. كما تحتوي درنات نبات الخرشوف (topinambur) (أرضي شوكي القدس) على 75٪ من الإينولين (inolin)، وهو بوليمر من الفروكتوز؛ حيث يمكن تحضير الفروكتوز منه بعملية أنزيمية يُستخدم فيها أنزيم الإينوليناز (inolinase).



السكريات ويدائل السكر		
الاسم	الحلاوة النسبية (نسبة إلى الساكاروز)	المادة البادئة، طريقة الإنتاج
الساكاروز	1.00	معزول من قصب السكر أو الشمندر السكري
الغلوكوز	**08-0.5**	**تحليل النشاء بـ α-أميلاز، غلوكوأميلاز**
شرابات الغلوكوز	**0.5-0.3**	**تحليل النشاء بـ α-أميلاز، غلوكوأميلاز**
شرابات الغلوكوز المهدرجة	0.8-0.3	هدرجة حُلالة النشاء أو شرابات الغلوكوز
الغلوكوز النظير 42	**0.9-0.8**	**مصاوغة أنزيمية للغلوكوز بإيزوميراز الغلوكوز**
الفركتوز	**1.7-1.1**	• **تحليل أنزيمي للساكاروز، أو** • **مصاوغة أنزيمية للغلوكوز، أو** • **تحليل أنزيمي للإينولينات(inolins)** متبوعة بفصل كروماتوغرافي
السكر المنقلب (المتحوّل)	**1.00**	**تحليل الساكاروز بالإنفرتاز**
مانيتول (mannitol)	0.5-0.4	هدرجة الفركتوز
سوربيتول (sorbitol)	0.5-0.4	هدرجة الغلوكوز
كزيليتول (xylitol)	1.0	هدرجة الكزايلوز
لاكتيتول (lactitol)	0.3	هدرجة اللاكتوز
مالتيتول (maltitol)	حوالي 0.9	هدرجة المالتوز
بالاتينيتول، (palatinitol) **إيزومالتول (isomaltol)**	**0.45**	**مصاوغة أنزيمية للساكاروز إلى نظير المالتولوز (بالاتينوز)، متبوعة بهدرجة ما يعطي مزيج من غلوكوبيرانوزايدو سوربيتول(glucopyranosido sorbitol) وغلوكوبيرانوزايدو مانيتول**

تحدد الحلاوة النسبية للمحليات بطريقة عضوية حسية كما وتقارن بمحلول ساكاروز مائي 10%. بالنتيجة، يمكن للقيم أن تتأرجح في حول وسطي



• أنزيمات لتحليل السيلولوز وعديدات السكر

(Enzymes for the hydrolysis of celluloses and polyoses)

عموميات (General). تستخدم أنزيمات السيلولاز (cellulases) ونصفِي السيلولاز (hemicellulases) غالباً في الصناعة الغذائية لإنتاج هريس الخضار والفواكه. وتضم تطبيقاتٌ أخرى عمليات صناعة عجينة الورق (pulp) والورق. كما تستخدم أنزيمات السيلولاز القلوية في بعض المنظفات كعوامل مطرية للأنسجة السيلولوزية (القطن). لقد تمت دراسة استخدام السيلولاز ونصفي السيلولاز بعمق من ناحية التحليل الأنزيمي للكتل الحيوية بغرض استعمالها لتوليد الغلوكوز كمادة خام في عمليات التخمير والطاقة (الإيثانول (ethanol))، إلا أن هذه التجارب لم تصبح بعد جذابة اقتصادياً.

السيلولوز (Cellulose). هي المادة المُحَدِّدة لشكل جدار الخلية النباتية. وهي أيضاً المصدر المتجدد الأكثر وفرة: يقدر الإنتاج السنوي من السيلولوز في الغلاف الحيوي (biosphere) بحوالى 20 بليون طن. يُبنى السلولوز من وحدات الغلكوز -D المتصلة برابطة β ـ 1، 4 (يبلغ متوسط درجة البلمرة (polymerization) حوالى 10000 وحدة)، والمرتبة بواسطة روابط هيدروجينية (hydrogen bonds) في حزم متوازية (ألياف دقية (microfibers)).

عديدات السكر (Polyoses) (نصفِي السيلولوز (hemicelluloses)) وهي مجموعة متغايرة من البوليمرات المتغايرة المبنية من السكر الخماسي (pentose)، والسكر السداسي (hexsoses)، ودي أوكسي السكر السداسي (deoxyhexoses)، وأحماض اليوريا السداسية (hexurenic acids)، فهي تشكل تقريباً 20٪ من الجدار الخلوي، وتضم: الكزايلوغلوكان (xyloglucans) (الكزيلان (xylan)) وهو يرتبط مباشرة بأنسجة السيلولوز الدقيقة عبر روابط الهيدروجين؛ يتألف هيكله (backbone) من ثمالات الغلوكوز المربوطة برابطة β ـ 1، 4، بالإضافة إلى عدد وافر من ثمالات الكزايلوز (xylose) على شكل فروع β ـ 1، 6، (β, 6-branches)، التي يمكن أن تصل لأطوال كبيرة. الأرابينوغالاكتان (arabinogalactans) ويرتبط بالبروتينات السكرية للجدار الخلوي؛ يتكون هيكله من تناوب ثمالات الغالاكتوز (galactose) والأرابينوز (arabinose) المتصلة بروابط β ـ 1، 4. والبنتوزان (pentosans)، الذي يتكون من تناوب ثمالات الكزايلوز والأرابينوز.

التفكيك الحيوي (Biodegradation). يتفكك السيلولوز (celluloses) ونصفِي السيلولوز (hemicelluloses) في الطبيعة بفعل البكتيريا وبفعل فطر العفن الأبيض بشكلٍ خاص. هذا الفطر يقوم بتحليل (hydrolyse) السيليلوز ونصفِي السيليلوز بالتوازي مع أكسدة الليغنين (lignin) باستخدام عدد من الأنزيمات غير الاعتيادية، حيث تبدأ العملية بتطرية ميكانيكية للجدار الخلوي عبر نمو الخيوط الفطرية المتشابكة ـ الميسيليوم ـ (mycelium). في بعض الكائنات الحية، مثل الـ Clostridia يوجد عدد من الأنزيمات المفكِّكة للسيليلوز التي تُظهر فعاليات متنوعة، مُجمَّعةً على شكل طاقم على منصة، تسمى بالسيلولوزوم (cellulosome).

أنزيمات السيلولاز (Cellulases). وهي يمكن أن تُعزل من كائنات مجهرية عديدة. فمن بين البكتيريا المعروفة أكثر من غيرها نذكر سلالات الـ Cellulomonas والـ Clostridium، ومن بين الفطور هناك *Trychoderma reesei*، *Asergillus niger*، *Humicola insolens* بالإضافة إلى غيرها. إن إنتاج هذه الإنزيمات في المفاعل الحيوي (bioreactor) يتم وفقاً للنمط الاعتيادي لإنتاج الأنزيمات الخارج خلوية (extracellular). إذ يمكن أن تحتوي مستحضرات الأنزيم التي تم الحصول عليها، بعد فصل الخلايا وتفريقها إلى أقسام (fractionation) من خلال الترسيب، على فعاليات جانبية من أنزيم نصفِي السيلولاز (hemicellulase)، التي يمكن أن تكون مرغوبة للتطبيق المنشود. وبالنسبة إلى أنزيمات السيلولاز المستخدمة في عملية تصنيع السكر (saccharification) من الخشب، فيتم تحضيرها بشكل أساسي من فطر العفن الأبيض *Trychoderma reesei*. يمكن أن يتم إنتاج مزيج أنزيمات تفكيك السيلولوز في المفاعل الحيوي عن طريق التخمير السطحي أو المغمور. ففي حالة استخدام الزرعات السطحية، يتم الحصول على مزيج الأنزيم باستخلاص الـ Koji بالماء. أما في عمليات التخمير المغمورة، فتزال الخلايا وتُقسَّم مكونات المرق (broth) بإضافة الإيثانول.

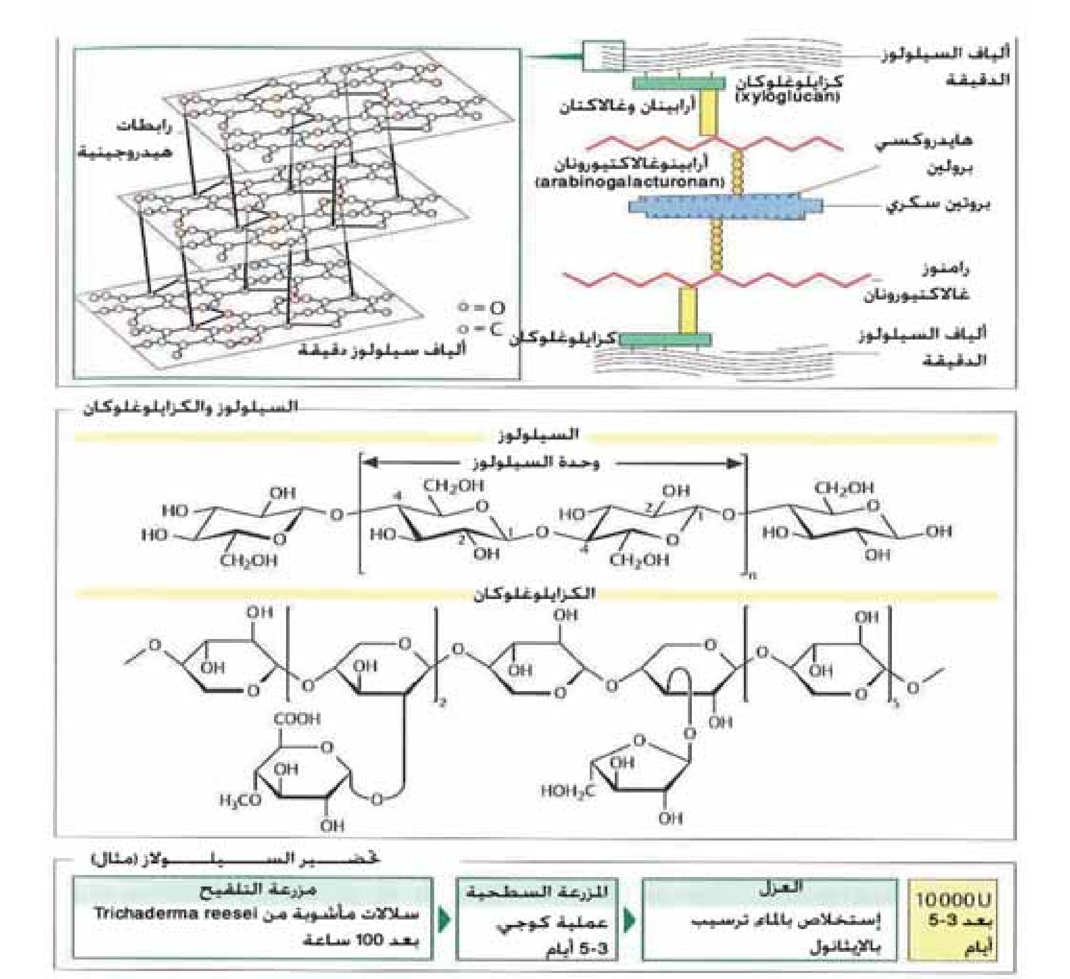
أنزيمات نصفِي السيلولاز (Hemicllulases). وتضم: أنزيم بيتا ـ غلوكاناز) الذي يُحَضَّر بعزله من *Bacils subtilis*، Penicillium emesoni، Aspergillus niger وسلالات أخرى. وأنزيمات المانناناز (mannanases) والغالاكتومانناناز (galactomannanases) المعزولين من *Aspergillus niger*، أو *Trychoderma reesei*. وبالنسبة إلى عملية إنتاجها فتُنفذ وفقاً للقواعد القياسية (standard rules) من أجل الحصول على الأنزيمات الميكروبية الخارج خلوية (extracellular).

الغلوكوز والزايلوز (Glucose and xylose). تعتبر تكاليف نقل المركبات الأولية (substrates) إلى المفاعل الحيوي وتحضيرها للتخمير، وكذلك كلفة الأنزيم، المعايير الأساسية بالنسبة إلى أية طريقة إنتاج تبدأ بالسيلولوز أو كتلة حية (رقاقات خشب، تفل قصب السكر وغيرها). وفيما يخص تحضير المركب الأولي، تجري إزالة الليغنين (lignin) في أغلب الأحيان بالتسخين و/ أو بالمعالجات الكيميائية القاسية المشابهة لتلك المستخدمة في تحضير عجينة الورق (pulp)، حيث يتفكك الكزايلوز جزئياً في هذه العملية. أما من حيث تكاليف الأنزيم، فإنها تصبح أقل إذا ما أمكن استخدام أنزيمات سيلولاز أو هيدروسيلولاز محبة للحرارة ومأشوبة.

مكونات عديدات الساكاريد في جدران الخلية النباتية

المركب	البنية	درجة البلمرة	وحدة البناء	النسبة المئوية
سيلولوز	β-1،4-غلوكوز -D	1000- 10000 ليف دقيق	غلوكوز -D	*الخشب: 60% القطن: 90%
بيكتينات	أحماض البولي غالاكتيورونيك(polygalacturinic acid)، أحماض الرامنوغالاكتيورونيك، (rhamnogalacturinic acid)، غالاكتانات، أرابينوغالاكتانات (arainogalactans)	100-2000	حمض غالاكتيورونيك-D، ميثيل استرات حمض الغالاكتيورونيك-D، رامنوز -L، D-أرابينوز	10-40%
عديد سكر (نصف السيلولوز)	كزيلانات (xylans)، كزايلوغلوكانات، β-1،3- و 1،4-غلوكانات-D، غالاكتومانانات (galactomannans)، أرابينوغالاكتانات (arabinogalactans)، غلوكيورونومانانات (glucuronomannans)		كزايلوز ، غلوكوز ، غالاكتوز ، مانوز ، أرابينوز ، حمض غلوكيورونيك	20%

* يحوي الخشب ~ 40% ليغنين (lignin) كثاني أكبر مكون



• أنزيمات معالجة عجينة الورق والورق
(Enzymes in pulp and paper processing)

عموميات (General). عجينة الورق هي عبارة عن مادة ليفية مكونة بشكلٍ أساسي من السيلولوز (cellulose). وهي تُنتَج بإزالة غالبيةً الليغنين (lignin) ونصفِي السيلولوز من الخشب. يُصنَّع منها الورق، والورق المقوى ومنتجات كيميائية. في العام 1996، أُنتج حوالى 150 مليون طن من عجينة الورق، وحوالى 250 مليون طن من الورق والورق المقوى (50٪ من الكمية الإجمالية في أمريكا الشمالية). يلزم لإنتاج 1 طن من الورق، 3.3 طن من الخشب؛ إضافةً إلى 0.4 طن من النفط لتأمين الطاقة اللازمة. إن مياه الفضلات الناتجة من مصانع عجينة الورق والورق هي عالية التلوث، فهي تحتوي على 1kg من الهالوجينات العضوية القابلة للادمصاص (adsorbable organic halogens (AOX)) و55kg BOD_5 (الطلب على الأكسيجين الكيميائي الحيوي في حضن لمدة خمسة أيام لكل طن من عجينة الورق. لذا تجري دراسة عمليات إنتاج محسنة؛ التي يجب أن تتطلب كميات أقل من المادة الخام والطاقة وأن تكون أقل ضرراً للبيئة. إن خصائص المنتجات النهائية لعجينة الورق والورق تتعلق بنوع الأشجار وبعملية التصنيع. فإلى جانب بعض أخشاب الأشجار القاسية التي تنمو بسرعة، استثنائية (الأُكاليبتوس والحور)، تفضل أخشاب الأشجار الطرية (البتولا أو شجر القضبان، الصنوبر، التنوب) لأنها تتكون من ألياف أطول بحيث يمكن أن تعالج بشكل أفضل. ومقارنة بالأخشاب القاسية، تحوي الأخشاب الطرية نسبة أقل من عديدات السكر (plyoses) (14 ـ 17٪)، ولكن، نسبة أعلى من الليغنين (26 ـ 32٪)، في وقتٍ تستمر البحوث القائمة على زراعة الأنسجة النباتية والهندسة الوراثية، في محاولتها لتخفيض محتوى الليغنين من الأخشاب الطرية.

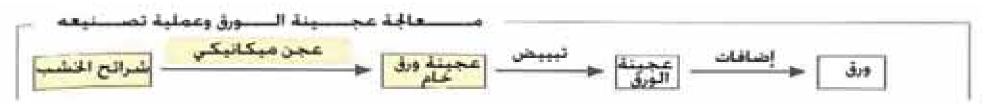
صناعة عجينة الورق (Pulp manufacturing). بعد قطع الأشجار وقشر لحائها، تقطَّع الأخشاب ميكانيكياً إلى شرائح بحيث تُحوَّل لاحقاً إلى عجينة بوسائل ميكانيكية، أو ميكانيكية ـ حرارية أو كيميائية. إن العملية الكيميائية السائدة حالياً هي عملية Kraft (80٪ من الإنتاج العالمي)، التي تقوم على إزالة بلمرة (depolymerization) الليغنين (lignin) قلوياً باستخدام $Na_2S/NaOH$ تحت ضغط مرتفع ودرجة حرارة 170ºC. وكبديلٍ من ذلك، يمكن إزالة الليغنين بإضافة الكبريت (sulfonation)، أي معالجة الخشب بفائض من السلفيت (sulfite) (عجينة ورق سلفيتية). تُتبع كلتا العمليتن بخطوة تبييض باستخدام الكلورين (chlorine) أو مشتقات الكلورين. وقد تمت دراسة خطوات للعملية تعتمد على الأنزيمات وذلك لإنتاج عجينة حيوية وتبييض العجينة الخام بشروط ألطف أو أكثر اعتدالاً.

إنتاج عجين الورق الحيوي (Biopulping). إن المعالجة السابقة لمرحلة التفكيك الميكانيكي بتعريض شرائح الخشب لكائنات مجهرية تفكك الليغنين (lignin) (إنتاج عجين الورق الحيوي (biopulping)) هي في طور الدراسة حالياً، وذلك باستخدام فطر العفن الأبيض في الغالب. فعلى سبيل المثال، يتم بطريقة Cartapip™ المطورة في Clariant، بخ شرائح الخشب بمغذيات وأبواغ فطر العفن الأبيض من *Ophiostoma piliferum*، ثم تترك لبعض الأسابيع. لقد تم اختبار هذه العملية على مستوى 100 طن؛ وذلك بعد اتباعها بعملية Kraft، مما أعطى عطاءً أعلى وتحسيناً في نوعية المنتجات.

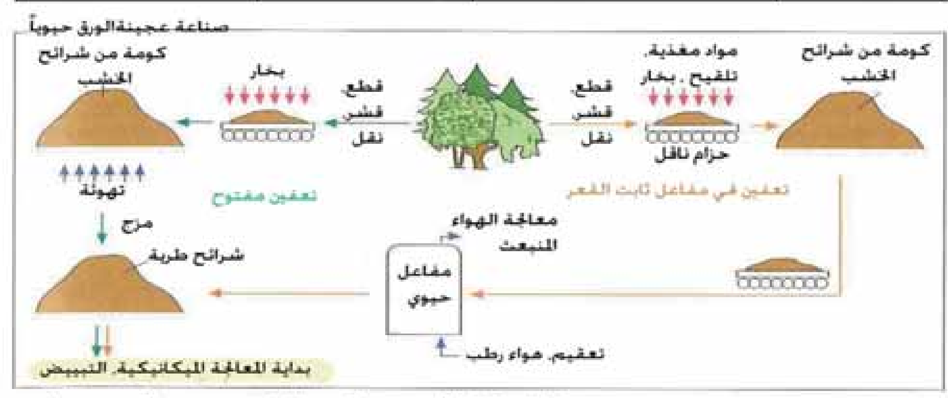
التبييض الأنزيمي (Enzymatic bleach). تتصف عجينة الورق الناتجة من عملية Kraft والمعالجة السلفيتية (sulfite treatment) ببنية هشة سهلة التقبل للأنزيمات. إن عملية التبييض التالية بواسطة ClO_2 هي ضرورية من أجل إزالة المنتجات الثانوية الملوَّنة. إلا أنه يمكن تحسين عملية العجن واستخدام كمية أقل من ClO_2 إذا ما تمت معالجة العجينة، خاصة تلك الواردة من خشب قاس، مسبقاً بأنزيمات الزايلاناز (xylanases). لقد تم اختبار هذه الطريقة الأنزيمية في مطاحن ورق مختلفة في الدول الاسكندنافية، وذلك بمستوى إنتاجي وصل إلى 1000 طن باليوم؛ بحيث أمكن تخفيض 5kg من ClO_2 لطن العجينة الواحد، مما يساعد في تعويض سعر الأنزيم وتخفيف مياه الفضلات الناتجة إلى الثلث. إن الأنزيمات التي تمت دراستها في هذه العملية هي معقدات أنزيمات الكزايلاناز المأخوذة من *Clostridium thermocellum* و*Streptomyces roseiscleroticus*، وكذلك مستحضرات الكزايلاناز، المأخوذة من البكتيريا *Thermotoga maritima* المحبة للحرارة التي تعيش في أعماق البحار، التي تعمل على درجة حرارة فُضلى قدرها 96ºC؛ بحيث أمكن إنتاجها عن طريق التأشيب باستخدام *Escherichia coli* كمضيف. والأمثلة على أنزيمات الكزايلاناز المتوفرة تجارياً هي تلك المنتجة من قبل *Trichoderma longibrachiatum* و*T.reesei*. لكنه في النهاية، لا يزال تطبيق هذه التقانات الأنزيمية هامشياً.

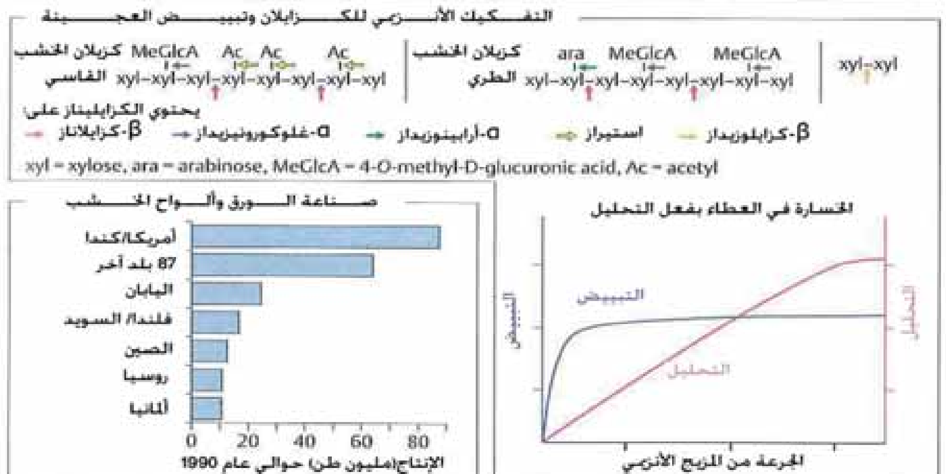
ضبط القار (Pitch control). تحوي بعض الأخشاب مثل الصنوبر، كمية كبيرة من الشحوم الثلاثية (triglycerides) التي تميل الى تشكيل القار في الظروف المتطرفة لتحضير عجينة الورق (pulp). لكن أنزيمات الليباز الميكروبية أثبتت كفاءة هامة في معالجة شرائح خشب الصنوبر مسبقاً وتجنب تشكل القار. كما تميزة هذه الطريقة بعدم تشكل مواد مكلورة من الأحماض الدهنية (faty acids) أثناء التبييض بالكلوراين. وبذلك يعتبر هذا التطبيق الأنزيمي حالياً الأكثر أهمية في معالجة عجينة الورق والورق.

إزالة حبر الطابعات. يزال حبر الطابعات في عملية إعادة تدوير الأوراق المطبوعة بكفاءة أكبر إذا عولج هذا الورق مسبقاً بمزيج من أنزيمات السيلولاز (cellulases)، الكزايلاناز (xylanase) والليباز (lipases).



الطريقة	الشروط	العمليات الكيميائية	ملاحظات
طريقة السلفات (طريقة كرافت (Kraft))	Na_2S، NaOH، ساعتين، ~170°C، pH=13–14	تفكيك اللغنين بـ HS^-	~80% من جميع مطاحن الورق؛ كذلك تفكك السيلولوز وعديد السكر، ما ينتهي إلى توفرها بشكل جزئي فقط
طريقة السلفيت	SO_2، HSO_3^-، SO_3^{-2}، تتعلق بـ Ca, Mg, Na, NH_4^+، pH=1–13، 1–4 ساعات، 125-180°C	تفكيك اللغنين بالسلفنة (إضافة السلفيت)	مقارنة مع طريقة كرافت، تفكك اللغنين هنا هو أقل
التبييض بالكلوراين	Cl_2، OCl^-، ClO_2	تفكيك اللغنين وتبييض المنتجات الثانوية الملونة بالكلورة	تشكل مركبات مريبة بيئياً
التبييض بـ O_2^-، H_2O_2		تفكيك اللغنين وتبييض المنتجات الثانوية الملونة بإضافة البيروكسيد (peroxidation)	





• أنزيمات البكتيناز (Pectinases)

عموميات (General). تتكون عادة أنزيمات البكتيناز (pectinases) التقنية من أنواع مختلفة من أنزيمات الهيدرولاز (hydrolases) والليباز (lipases). وهي تقوم بتفكيك البكتين (pectin)، وبالتالي تغير من تركيب ولزوجة الفواكه والخضار المهروسة. وكنتيجة لذلك، إن هذه الأنزيمات هي هامة في معالجة الفواكه والخضار بحيث تصنع عالمياً بمستوى 1000 طن بالسنة.

البكتينات (Pectins). عبارة عن عديدات سكريد حمضية ذات وزن جزيئي (M_R) يتراوح بين 30000-300000 Da. يختلف تركيبها بشكل واسع، لكن وحدة بنائها الأساسية هي حمض غالاكتورونيك ذي الوضعية (D-galactourinic acid) المرتبط ببعضه البعض برابطة δ ـ 1، 4 الذي يمكن أن يكون مؤستراً (esterified) بالميثانول (methanol). كما يمكن أن توجد فيها أيضاً تسلسلات غنية بالـ رامنوز -D، -D (rhamnose)، التي تحمل سلاسل جانبية من الأرابينوز -D، (D-arabinose)، والكزايلوز -D، (D-xylose) والغالاكتوز -D (D-galactose). تشكل البكتينات ذات الوزن الجزيئي المرتفع التي تكون عالية الأسترة (esterified) الطبقة الرقيقة (lamella) المتوسطة غير المنحلة في الماء للجدار الخلوي الأولي في النباتات (البكتين الأولي (protopectin) أو «أسمنت الخلية»). ويتحول البكتين الأولي إلى بكتينات ذات سلاسل أقصر سلبية الشحنة، قادرة على أن تتشابك وتشكل الهلام بوجود أيونات الكالسيوم (Ca^{2+})، وذلك من خلال إزالة بلمرة (depolymerization) وتحليل (hydrolyse) رابطة الاستر. تؤدي هذه العملية، التي تحدث بشكل طبيعي عند نضج الفواكه والخضار، إلى تغيرات كبيرة في الخصائص البنيوية والفيزيائية والكيميائية. لذا فإن التفكيك المعتدل للبكتينات بواسطة مستحضرات البكتيناز (pectinase) مطلوب أثناء الإنتاج الصناعي لهريس وعصير الفواكه.

أنزيمات البكتيناز (Pectinases). وتضم الأنزيمات التالية:

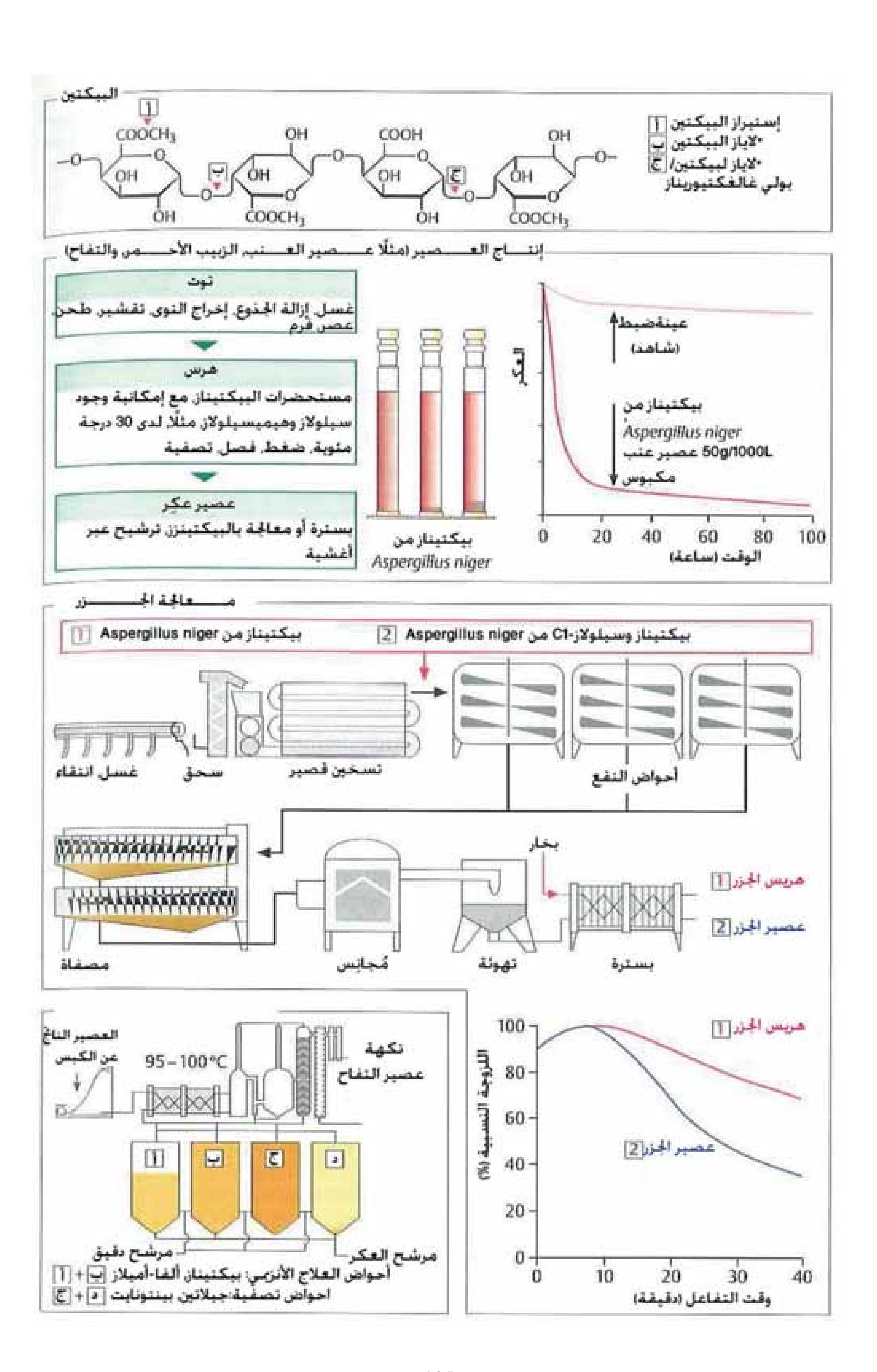
1. أنزيمات البولي غالاكتويوروناز الداخلية (endopolyglacturinases) [EC 3.2.1.15]
2. أنزيمات البولي غالاكتويوروناز الخارجية (exopolyglacturinases) [EC 3.2.1.67]
3. لاياز البيكتات (pectate lyase) [EC 4.2.2.2]
   لاياز البيكتات الخارجي (exopectate lyase) [EC 4.2.2.9]
4. لاياز البيكتين (pectin layase) [EC 4.2.2.10]
   استراز البيكتين (pectin esterase) [EC 3.1.1.11]

وتحوي أنزيمات البكتيناز المتوفرة تجارياً نسباً مختلفة من الأنزيمات المذكورة أعلاه لتعطي الخاصة المرغوبة أثناء التطبيق.

التحضير التقني (Technical preparation). إن كافة أنزيمات البكتيناز (pectinases) المسوقة حالياً هي محضرة من أعفان مثل Aspergillus أو Rhizopus، المصرح باستخدام أنزيماتها في التطبيقات الغذائية (بمرتبة المواد المعترف بأمانها بشكل عام (GRAS)). تتم غالبية هذه التحضيرات الأنزيمية بواسطة التخمير السطحي للأعفان؛ إذ يمكن أن يحتوي الوسط، مثلاً، على نخالة قمح متروكة في رطوبة عالية، وبعد حوالى 100 ساعة من الزرع، تُستخلص الزرعة بمحلول دارئ (buffer solution). يجري تركيز الخلاصة بالترشيح الفائق (ultrafiltraton) كما تتم إزالة الأبواغ (spores) بالترشيح المجهري (microfiltration). ثم بعد إتمام إضافة المثبتات مثل الغليسيرول (glycerol) أو السوربيتول (sorbitol) يجري تعيير (standerize) المستحضر من حيث الفعالية الأنزيمية (وهي صعبة بسبب وجود مجموعة واسعة من الأنزيمات الفعالة مثل السيلولاز (cellulase)، نصفي السيلولاز (hemicellulase) والغلوكوزيداز (glucosidase)) ليُباع بعدها في السوق. يمكن تحضير مستحضرات ذات فعاليات محددة بشكل جيد عن طريق تقانات الهندسة الوراثية، لكن قبولها ما زال موضع تساؤل بسبب مخاوف المستهلكين. إضافةً إلى ذلك، تتوفر أيضاً مستحضرات أنزيمية مجففة بالبخ (بالترذيذ) إلى جانب المستحضرات المركزة.

التطبيقات (Applications). تستخدم مستحضرات البيكتيناز (pectinases) في 1) نقع (maceration) الخضار والفواكه («النقيع»)، 2) معالجة هريس الفواكه أثناء تحضير عصائر الفاكهة أو العنب، لتعزيز إمكانية الترشيح وزيادة العطاء، 3) معالجة عصارة (must) العنب، لإزالة مادة البكتين المعلقة، و4) معالجة الحمضيات، لتجنب تشكل الهلامات (gels). يستخدم إجراء النقع بالبيكتيناز في إنتاج الفواكه والخضار المهروسة لأغذية الأطفال، وعصائر الفاكهة العكرة واللبن بالفواكه. وإذا أضيف البيكتيناز أثناء إنتاج العصير، فإنه يمكن تحسين العطاء بنسبة 5 ـ 10٪، وزيادة الترشيح بعامل 1.5 إلى 5 تبعاً لنوع الفاكهة.

أنزيمات السيلولاز ونصفِي السيلولاز (Cellulases and hemicellulases). تستخدم غالباً في معالجة الأغذية، مثل تحضير النشاء من الذرة واستخلاص حبوب البن وأوراق الشاي. وإذا أضيفت إلى البيكتيناز (pectinases) فإنها يمكن أن تحسن عمليات معالجة الخضار والأغذية. كما تساعد أنزيمات الغلوكاناز (glucocanases) البكتيرية أو الفطرية في تشقق الشعير المنقوع (malt) المستخدم في معامل البيرة، لتسريع تشكل الهريس أثناء عملية إنتاج البيرة.



البكتين
إستيراز البيكتين [1]
•لاياز البيكتين [ب]
•لاياز لبيكتين/ [ج]
بولي غالغكتيوريناز
إنتاج العصير (مثلًا عصير العنب، الزبيب الأحمر والتفاح)
توت
غسل، إزالة الجذوع، إخراج النوى، تقشير، طحن، عصر، فرم
هرس
مستحضرات البيكتيناز مع إمكانية وجود سيلولاز وهيميسيلولاز مثلًا، لدى 30 درجة مئوية، ضغط، فصل، تصفية
عصير عكِر
بسترة أو معالجة بالبيكتينزن، ترشيح عبر أغشية
بيكتيناز من
Aspergillus niger
العكر
عينةضبط
(شاهد)
بيكتيناز من
Aspergillus niger
عصير عنب 50g/1000L
مكبوس
الوقت (ساعة)
معالجة الجزر
بيكتيناز من Aspergillus niger [1]
بيكتيناز وسيلولاز-C1 من Aspergillus niger [2]
غسل، انتقاء
سحق
تسخين قصير
أحواض النقع
بخار
هريس الجزر [1]
عصير الجزر [2]
مصفاة
مُجانِس
تهوئة
بسترة
العصير الناتج عن الكبس
95–100 °C
نكهة
عصير التفاح
مرشح دقيق
مرشح العكر
أحواض العلاج الأنزيمي: بيكتيناز ألفا-أميلاز [ب] + [1]
احواض تصفية: جيلاتين، بينتونايت [د] + [ج]
اللزوجة النسبية (%)
هريس الجزر [1]
عصير الجزر [2]
وقت التفاعل (دقيقة)

• الأنزيمات ومُنتَجات الحليب

(Enzymes and milk products)

عموميات (General). تستخدم أنزيمات البروتياز (proteases)، اللاكتاز (lactases)، والليباز (lipases) بشكل أساسي في تصنيع منتجات الحليب. وتتجلى العملية الأنزيميةً الأساسية في استخدام أنزيمات بروتياز عالية النوعية (التخصص) (منفحة التجبين ـ الرينين ـ (Rennins)) وذلك من أجل إنتاج الجبن؛ فقد استخدم عام 1995 حوالى 1000 طن من الأنزيم لهذه الغاية. ثم بعد ذلك، يمكن أن تتأثر نكهة الجبن بفعل أنزيمات الليباز والبروتياز. ونظراً إلى عدم تحمل اللاكتوز (سكر الحليب) من قبل بعض البالغين، فقد تم تطوير منتجات حليب معالجة بأنزيم اللاكتاز (lactase) (بيتا ـ غالاكتوزيدايز (β-galactosidase)). كما أنه ولزيادة ثباتية منتجات الحليب تجاه التلوث الميكروبي، يُعمد في بعض البلدان المتطورة إلى إضافة الليزوزايم (lyzozyme) أو كاتالاز (catalase) الـ H_2O_2. وفي الختام، تمت دراسة استخدام مصل اللبن كمادة أولية في التخمير، حيث يُنتَج منه حوالى 50 مليون طن (عالمياً) أثناء إنتاج القريشة (cottage cheese) والأجبان.

الحليب (Milk) وهو عبارة عن مستحلب من الزيت في الماء بمحتوى مائي بحدود 90٪. تحتوي شحوم الحليب الثلاثية (triglycerides) (زبدة الحليب)، بشكل غير اعتيادي على 2 ـ 4٪ من حمض البوتيريك (buteric acid). وتبلغ نسبة اللاكتوز (lactose) والبروتين حوالى 3٪ لكلٍ منهما. إن الكازيئين (casein) هو المكون الأساسي للبروتين في الحليب، وهو مزيج من البروتينات المفسفرة ذات وزن جزيئي بين 30-20 kDa. يشكل هذا البروتين تكتلات بحوالى المليون دالتون (Da)، حيث يفيد القسم كابا ـ كازيئين) كمادة غروانية واقية. ولكن لكي تصبح هذه المادة قابلة للهضم، فإنه يجب أن تفكيكها أولاً؛ الذي يمكن أن يُنفذ بعدة طرق: إما بوجود أيونات الكالسيوم (Ca^{+2}) بتراكيز أعلى من 6 mmol، أو بإنقاص قيم الرقم الهيدروجيني (pH) إلى أقل من 4.6، أو من خلال تحليل (hydrolyse) رابطة ببتيدية واحدة من الكابا ـ كازيئين (فينيل ألانين [105] ـ ميثونين [106]) بواسطة الكيموزين (منفحة التجبين)، وهو بروتياز (protease) موجود في القسم العلوي من الجهاز الهضمي عند الثديات.

أنزيمات البروتياز المحللة للكازيئين (Casein-hydrolyzing proteases). في معدة الثدييات، يتم تحليل الكازيئين أولاً بواسطة الكيموزين وأحماض المعدة، ليصبح بعد ذلك أكثر عُرضةً للتحلل البروتيني. إن الإجراءات التقانية ذات العلاقة التي تحوِّل الحليب إلى لبن حامض (sour milk) أو جبن من خلال إضافة منفحة التجبين ـ مادة الرينين ـ (rennin) المستخرجة من أمعاء البقر أو الماعز أو الخراف هي واحدة من أقدم ابتكارات حفظ هذا الغذاء القابل للتلف بسرعة. فقد كانت تُستَخدم تحضيرات من مِعَد الحيوانات في الطريقة التقليدية لصناعة الجبن. إلا أن هذه التحضيرات لم تكن نقية كما أنه كان من الصعب مقايستها (standardized). نتيجة لذلك، أصبحت تفضل منفحة التجبين الميكروبية، أو حديثاً، الكيموزين المأشوب (recombinant). تُظهر منفحة التجبين الميكروبية، التي هي بروتياز مأخوذ من عفن الـ *Mucor miehei*، نفس النوعية (specificity) (فينيل ألانين [105] ـ ميتيونين [106]) المشاهدة عند الكيموزين الحيواني، وهي تستخدم اليوم بشكل واسع. ففي عام 1987 تمت كلونة كيموزين العجل والتعبير عنه في بكتيريا *E.coli* وخميرة *Succharomyces cerevisiae*. ومنذ عام 1992، سمحت إدارة الغذاء والدواء (FDA) في الولايات المتحدة الأمريكية باستخدام الكيموزين المأشوب في صناعة الجبن، كما صُرِّح باستخدامه عام 1997، في الاتحاد الأوروبي واليابان.

التحليل المائي للاكتوز (Lactose hydrolysis). تتحمل غالبية الثدييات اللاكتوز (سكر الحليب) بشكل جيد فقط حتى مرحلة النضج. كما يُظهر الأناس البالغون، باستثناء غالبية القوقازيين الشماليين، عدم تحمل مشابه تجاه اللاكتوز. في الواقع، يحدث هذا بسبب انخفاض كبير في تشكل أنزيم اللاكتاز (lactase) عند سن البلوغ، مما يؤدي إلى مرور اللاكتوز بشكلٍ غير منهضم إلى الأمعاء الغليظة؛ حيث يتخمر هناك بفعل الفُلورا المعوية (intestinal flora) مما يؤدي إلى تشكل غازات بصورةٍ زائدة. ويجب التمييز فيما بين عدم تحمل اللاكتوز والمرض الوراثي النادر المعروف بالغالاكتوزمية (galactosemia). فهذا الأخير يعود إلى عيب في جين الوراثة المتنحية (autosomal recessive gene) على الصبغي رقم 9، الذي يؤدي إلى نمط ظاهري (Phenotype) لايصنِّع فيه الغلاكتوز المرتبط باليوريدين ثنائي الفوسفات (UDP-galactose). وبالتالي ينتهي إلى إفراط في إنتاج مستقلبات (metabolites) الغلاكتوز، وخصوصاً الغالاكتول (galactol) السام. وفي حين يكون اتباع حمية خالية من الغالاكتوز أمر لا بد منه بالنسبة إلى المصابين بالغالاكتوزمية، إلا أن تجنب عدم تحمل اللاكتوز يمكن أن يتم بعدم تناول اللاكتوز أو بتحليل اللاكتوز أنزيمياً في منتجات الحليب. تتوفر منتجات الحليب المعالجة مسبقاً باللاكتاز (lactase) من أجل تصنيع منتجات الحليب المخمرة مثل الألبان وشرابات اللاكتوز المُحلَّلة المستخدمة في المخابز وأعلاف الحيوانات القائمة على مصل اللبن؛ حيث إن حلاوة اللاكتوز المُحلَّل تتجاوز حلاوة السكريدات الثنائية (disaccharides) الطبيعية.

نكهة الجبن (Cheese aroma). يمكن القيام بتحليل الأحماض الدهنية القصيرة والمتوسطة السلاسل الموجودة في زبدة الحليب بواسطة أنزيمات الليباز (lipases) والحصول على مزيج من المنتجات المفيدة بنكهتها في إنتاج الجبن (أجبان معدلة أنزيمياً (EMC))؛ إذ يمكن إنتاج نكهات متنوعة اعتماداً على نوعية (specificity) الليباز تجاه طول السلسلة.

تركيب الحليب		
	الحليب (%)	مصل اللبن (%)
ماء	88~	94~
دسم	4-3~	0.5~
بروتين	3.3~	1~
كازيين	2.6~	~
لاكتوز	~	4.8~

البلازميد

للتعبير عن الكيموزين في *E. coli*

محضض التريبتوفان

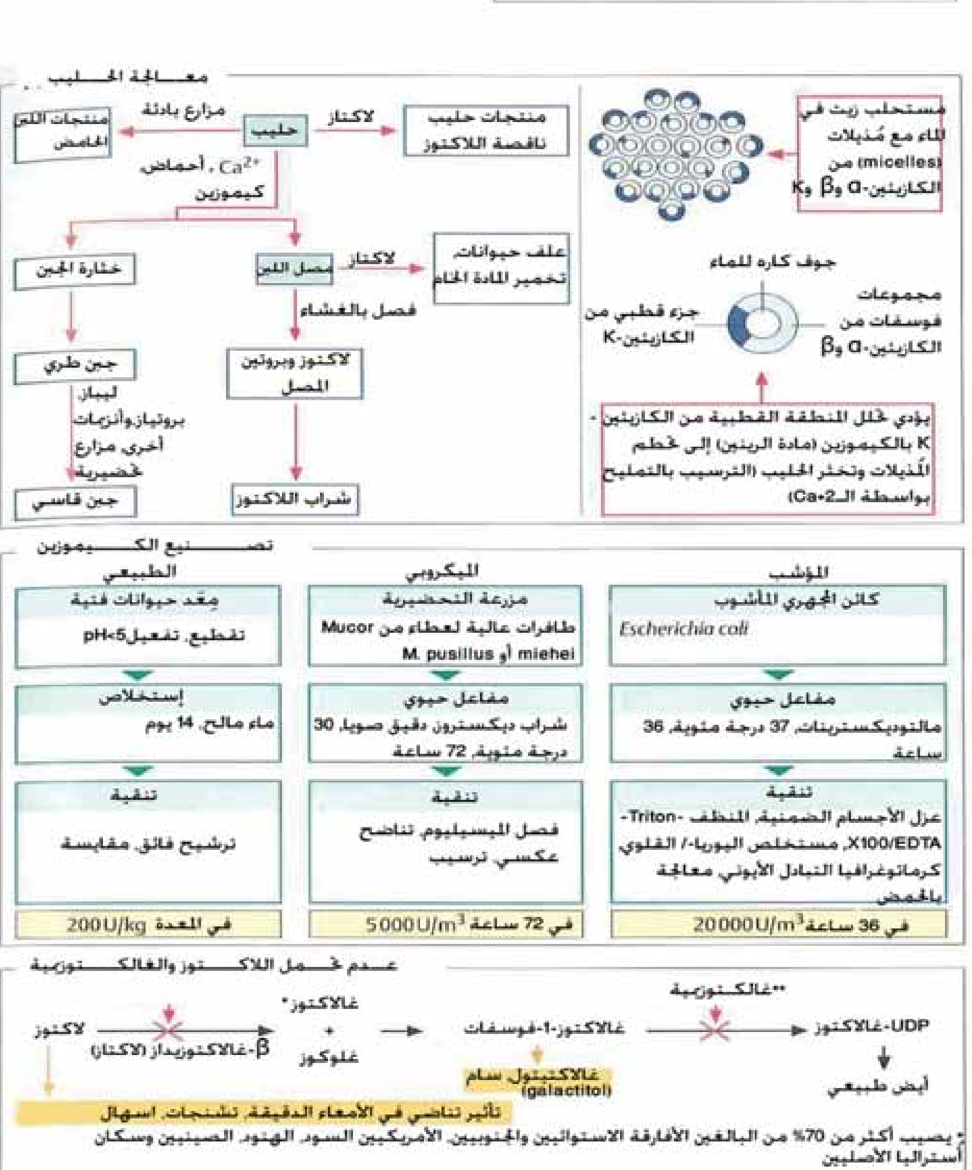
نقطة بداية التضاعف

بادئة كيموزين

pCT66

منهي T7

amp^R



** غالاكتوز-1-فوسفات-يوريديل ترانسفيراز عيب في الصبغي رقم 9، تواتر الحدوث 1:100000

• أنزيمات صناعة الخبز وتحضير اللحوم

(Enzymes in baking and meat processing)

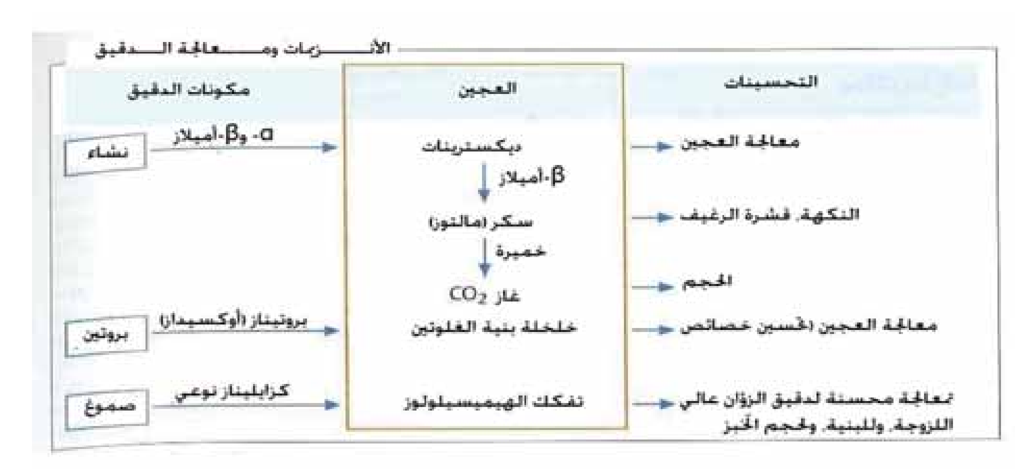
عموميات (General) . إن التطبيق الأكثر أهمية للتقانة الحيوية في منتجات الأفران يتجلى في تحضير عجينة الخميرة (yeast dough) والعجين المتخمر (sourdough) . فعند تحضير العجين المتخمر يزيد التخمير المزدوج بفعل بكتيريا حمض اللبن (lactic acid bacteria) وخميرة *Saccharomyces cerevisiae* من إمكانية هضم طحين الزؤان (rye meal) . كما تستخدم أنزيمات مثل الألفا ـ أميلاز (α-amylases)، والغلوكوأميلاز (glucoamylases)، والبروتياز (proteases) والكزايلوزاناز (xylolanase) في عمليات تحضير العجين والمخبوزات. هناك أنزيمات كزايلاناز خاصة تُستخدم من أجل تثبيط (inhibit) تشكل هلامات قائمة على البنتوزان (pentosane-based gels)، ما يؤدي إلى انخفاض اللزوجة، وبالتالي تحسين معالجة طحين الزؤان والقمح. أما أنزيمات الألفا ـ أميلاز، والغلوكوأميلاز، والبروتياز فتستخدم على نحو مفيد في كافة أنواع الطحين حيث إنها تعدل من خصائص النشاء والغلوتين (gluten) مما يُعطي اللزوجة المرغوبة للعجين وتحسناً في قابلية تخمره. ومن أجل منع أن يصبح الخبز بائتاً، يستخدم أنزيم بيتا ـ أميلاز) المولد للمالتوز (maltogenic) كمادة مضافة. يقدر الاستخدام الصناعي للأنزيمات في الأفران بحوالى 1000 طن (عالمياً). أما عند تحضير النقانق فتستخدم غالباً مزارع بادئة بحيث تؤثر في النكهة والحفظ. كما تُستخدم أنزيمات البروتياز، مثل البابابن (papain) الذي يعتبر البروتياز الأساسي لزيادة طراوة اللحم.

الأنزيمات ومعالجة الطحين (Meal processing and enzymes) . يؤدي طحن الحبوب إلى إنتاج طحين يعتمد تركيبه من حيث النشاء والبنتوزان (pentosan) والبروتينات على نوع الحبوب (قمح، زؤان. . . الخ)، إضافةً إلى تركيب التربة والمناخ وفترة الحصاد. يمكن تعديل تركيب الطحين عن طريق إضافة أنزيمات مناسبة. فأنزيمات الأميلاز تقوم بإزالة بلمرة (depolymerization) النشاء لإعطاء الديكسترينات (dextrins) (بفعل أنزيم الألفا ـ أميلاز) (α-amylase) أو المالتوز (maltose) (بفعل أنزيم البيتا ـ أميلاز)) وفي النهاية الغلوكوز (glucose) . ونتيجة لذلك، تؤثر إضافة هذه الأنزيمات في عملية تحضير العجين ونكهته وحجمه (فخميرة الخبز باستطاعتها فقط أن تخمر الساكاريدات الأحادية (monosaccharides) والثنائية (disaccharides)). وأنزيم البيتا ـ أميلاز، المولد للمالتوز (maltogenic) والمأخوذ من *Bacillus stearothermophilus*، تم إثباته كإضافة أنزيمية ممتازة لتجنب غدو مذاق الخبز بائتاً.

وأنزيمات البروتياز التي تقوم بتحطيم الهلام، المتشكل من جراء ارتباط بروتين الغلوتين (gluten) الموجود في الحبوب بالماء المضاف أثناء إنتاج العجين، وذلك بشكلٍ جزئي لتزداد مرونة العجين، وهو شرط لازم لاحتباس الـ CO_2 المتشكل أثناء التخمر بشكل جيد. إلا أن إضافة المزيد من البروتياز تؤدي إلى تخفيض خصائص المرونة واللزوجة المطلوبة، وبالتالي إلى جعل بنية العجين العامة طرية. بالإضافة إلى أنزيمات الألفا ـ أميلاز، المأخوذة من الملت (malt) والمنتجة من قبل سلالات الـ Bacillus أو الأعفان، والغلوكوأميلاز العفنية، المستخدمين بشكلٍ عملي. ولكون الإنتاج الصناعي للخبز يتطلب دائماً أوقاتاً أقصر في تحضير العجين والتخمير، فإنه يجري استخدام أنزيمات ذات فعاليات مرتفعة. إذ يفضل الأنزيم المعزول من *Aspergillus oryzae* من بين أنزيمات البروتياز. فهو يفكك الغلوتين بالشكل المرغوب بدون أن يؤدي إلى تحطيمه بشكلٍ زائد.

الطرائق التحليلية (Analytical methods) . تسيطر على هذا الحقل الطرائق التقليدية المتعلقة بالفن التقليدي. لذا، يتم رصد تشكل الغاز بأنابيب الغاز، ويقاس تناقص اللزوجة بطريقة هبوط العدد (falling numbe method) . ولتقييم فعل البروتياز (protease)، تستخدم مخططات الدقيق (farinograph) أو التمدد (extensogram) أو الأجواف الهوائية (alveogram) التي تعطي جميعها معلومات عن خصائص المرونة واللزوجة للغلوتين (gluten) .

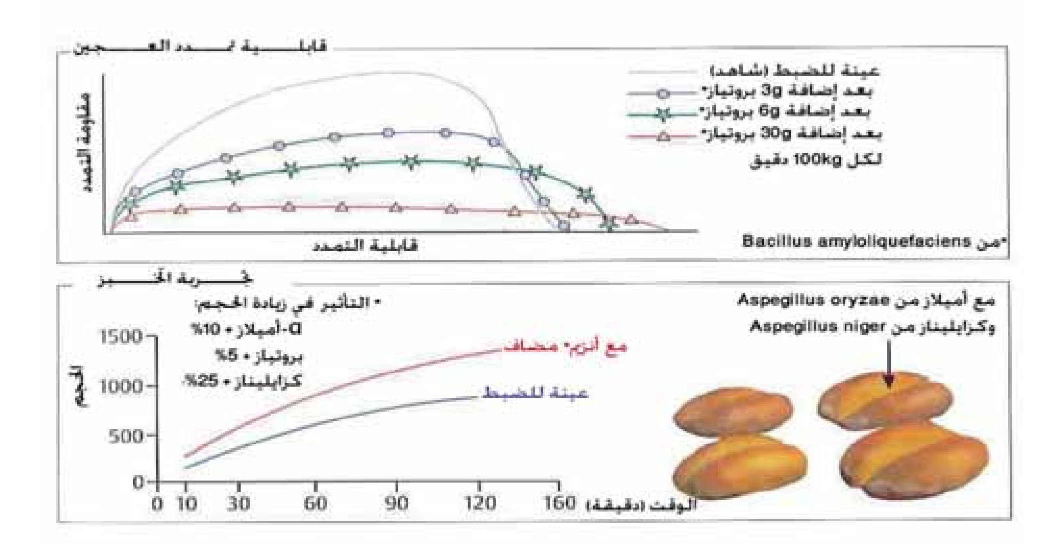
اللحم والأنزيمات. يتشكل اللحم من العضلات عبر تحولات كيميائية حيوية (biochemical) معقدة بعد إيقاف التزويد بالأكسيجين. وتلعب أنزيمات البروتياز (protease) (الكايثبسين (cathepsins)) دوراً هاماً في هذه التحولات. من وجهة نظر المستهلك، تشكل صفات اللحم مثل كثرة العصارة، وسهولة المضغ، والمظهر واللون وكذلك الطعم المُرضي الاهتمامات الأساسية. ففي الثقافات الغربية، يتم تأمين ذلك تقليدياً بالحفظ والنقع بالماء المالح أو الخل (marination) . أما في ثقافات أخرى، فيتم تغليف اللحم بأوراق البابايا (papaya)، أو نقعه في عصير الأناناس لجعله طرياً وتعزيز نكهته. كما يُحدِث رذ (بخ) اللحم بالبابابن (papain)، وهو بروتياز كبريتي معزول من أوراق البابايا، نفس التأثير. وكبديل، يمكن حقن البابابن المعطل (inactivated)، من خلال أكسدة مجموعة السلفيدريل (sulphydryl group) بالماء الأكسيجيني (H_2O_2)، في مجرى دم الحيوانات قبيل قتلها؛ حيث يعاد تنشيط مجموعات السلفوكسي في البابابن بعد موت الحيوان باختزال أكسيجين الدم، مما يؤدي إلى تحليل (hydrolysis) جزئي سريع للحم.



أنزيمات صناعة الخبز

الأنزيم	التأثير في الدقيق	طريقة التحديد	الأثر في المنتجات المخبوزة
α-أميلاز من الملت، Bacillus، Aspergillus غلوكوأميلاز من *Aspergillus oryzae*	تكشف حبوب النشاء المحطمة والنشاء الملتصق إلى المالتوز والغلوكوز	تشكل غاز *، قياس اللزوجة (بالرسم البياني للنشاء أو بالرقم الهابط)، تجارب صناعة الخبز	زيادة الحجم، قشرة رغيف وطعم أفضل
أنزيمات بروتياز معتدلة مأخوذة من الأعفان	تفكيك الغلوتين	خصائص المرونة واللزوجة في الرسم البياني للدقيق، الرسم البياني للتمدد... الخ	زيادة لزوجة العجين، احتباس أفضل للغاز
كزايلاناز من *Trichoderma viride*	تحلل الصموغ	قياس اللزوجة في الرسم البياني للنشاء	تحسين تحمل التخمير
β-أميلاز من B.stearothermophilus، Aspergillus	تجنب تأثر النشاء مع الغلوتين	تجارب صناعة الخبز، اختبارات عضوية حسية	طازجة لمدة أطول، بنية أفضل، مضاد للتفتت

* يمكن لخميرة الخبز (*Sacharomyces cerevisiae*) أن تفكك المالتوز والغلوكوز فقط، أما قليلات السكر العليا فلا تستطيع تفكيكها.



• أنزيمات معالجة الجلد والأقمشة

(Enzymes in leather and textile treatment)

عموميات (General). تعود عملية تحضير الجلد من جلود الحيوانات إلى العصور القديمة. وقد استخدمت عبر التاريخ مواد كيميائية جالفة مثل أوكسيد الكالسيوم (lime) والقلويات والكبريت، وكذلك البراز والبول، بدون معرفة علمية، كمصدر للأنزيم، لذلك اعتبرت الدباغة «مهنة غير نظيفة». كان أوتو روهم (Otto Roehm) في ألمانيا، أول من وضع أسس لمعالجة الجلود بمقاربة تقنية علمية، مما أدى إلى تحسن كبير في صورة هذه المهنة. تقدر كمية أنزيمات البروتياز (protease) المستخدمة اليوم (عالمياً) في معالجة الجلود بمستوى بضعة مئات من الأطنان سنوياً.

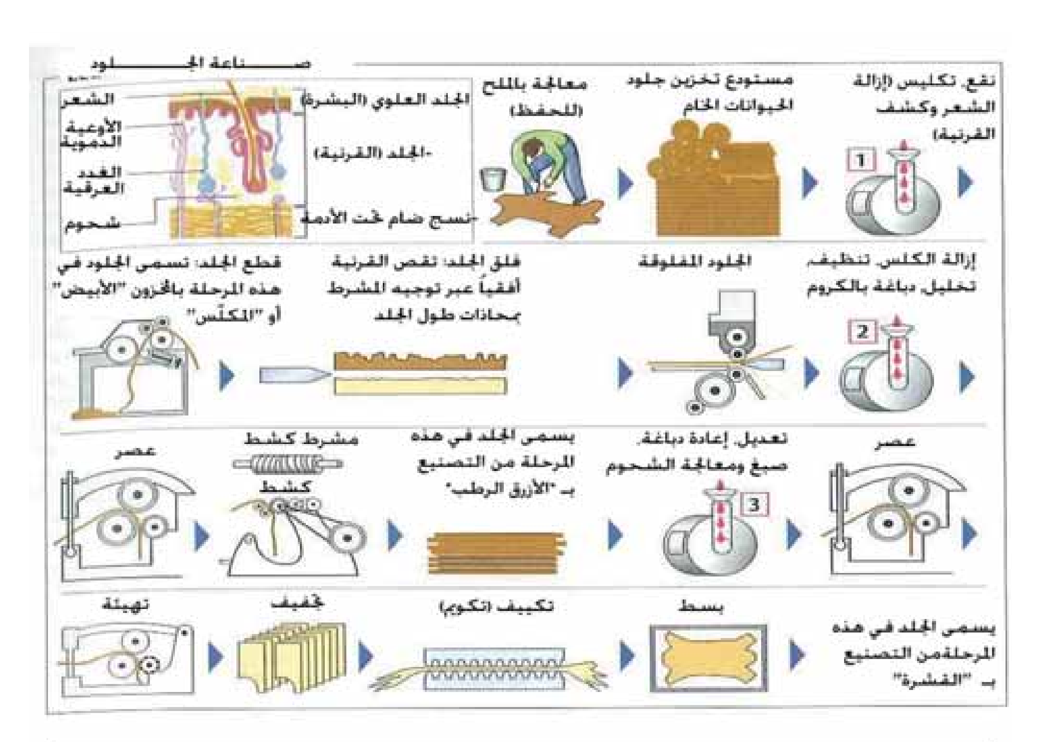
الجلد (Leather). يتكون جلد الحيوانات من 60 ـ 65٪ ماء، وحوالى 30٪ بروتين (أكثر من 90٪ كولاجين (collagen)، بالإضافة إلى الكيراتين (keratin) والإلاستين (elastin) وبروتينات أخرى زهيدة) و2 ـ 10٪ دهون. تشكل الأدَمَة الخارجية (epidermis) (الجلد العلوي) فقط حوالى 1٪ من الجلد؛ وهي مقسمة إلى طبقة متقرنة (*Stratum corneum*) خارجية (طبقة قرنية)، وطبقة حبيبية (granular)، وطبقة مخاطية. وتشكل الأدَمَة/ قرنية الجلد (dermis/*corneum*) 85 ٪ من سماكة الجلد؛ تتكون من طبقة حُليمية (papillary)، وألياف كولاجين وطبقة شبكية (reticular) من النسيج الضام (connective tissue). أما الطبقة النهائية الموجودة تحت الأدمة (hypodermis) فتشكل حوالى 15٪ من سماكة الجلد وتحتوي على الكولاجين، والعضلات والنسيج الدهني، وأوعية دموية وأعصاب. يصنع الجلد من طبقة الجلد الطبيعي الذي أزيل منه الشعر، والنسيج الدهني، والبروتينات غير الليفية والماء، ثم تم تثبيته في خطوات معالجة مختلفة. وجلود الحيوانات غير المثبتة تتلف بسرعة في البيئة الرطبة، وتفقد إثر التجفيف قابليتها للطي ولأخذ أشكال مختلفة.

الأنزيمات ومعالجة الجلود (Leather treatment and enzymes). تحفظ جلود الحيوانات بعد نزعها مباشرة عن الجثث بإزالة الماء منها (بالتمليح مثلاً) لتجنب الانقضاض الميكروبي. وفي ما يسمى دكان الماء (water shop)، تتوالى عدة خطوات: فخلال عملية النقع، يزال الدم والأوساخ والأملاح والدهون والبروتينات غير الليفية، بإضافة الماء، ومخفضات التوتر السطحي (surfactants) وعوامل اختزالية (reducing agents). كما ويمتص الجلد الماء من جديد في هذه الخطوة. تساند أنزيمات حالة للبروتين (proteolytic) عملية التليين هذه بشكل معتبر: فهي تساعد في إجراءات إزالة الأصبغة والدهون وغدد إفراز العرق، التي هي شرط لازم للتوصل إلى جلد أنيليني (aniline leather) ذي قيمة مرتفعة وخالٍ من الندب. إن الأنزيمات المستخدمة في هذه العملية يجب أن تُظهر فعالية حل للبروتين مرتفعة بدون التعرض للكولاجين (collagen)؛ في وقتٍ يعتبر أنزيم التريبسين (trypsin) (من خلاصات بنكرياسية) وأنزيمات البروتياز (proteases) المأخوذة من *Bacillus subtilis* أو *Aspergillus sojae* مناسبة بشكل جيد لهذه الغاية.

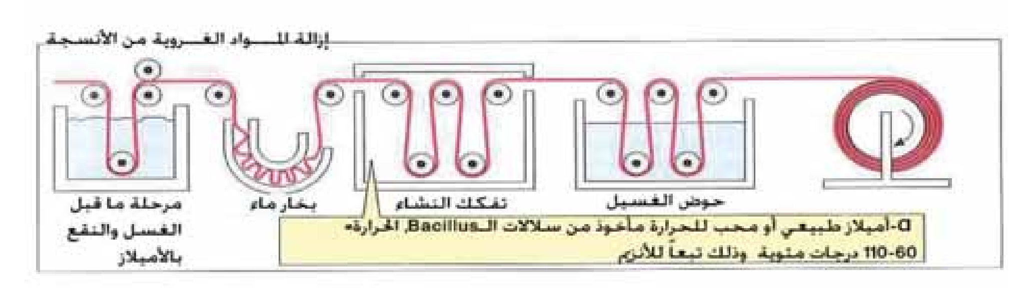
وفي عملية المعالجة بالكلس (liming) التالية، تتم إزالة الأدَمَة الخارجية (epidermis) والشعر المتبقي ويُكشف الجلد لإجراءات الدباغة اللاحقة؛ التي يُعتَبر استخدام أوكسيد الكلس (lime) وسلفيت الصوديوم (sodium sulfite) فيها مناسبين بشكل خاص. ففي حين أن هذه المواد كانت تُستعمل يدوياً في حرفة الدباغة التقليدية، إلا أنه اليوم أصبحت تُستخدم كواشف قلوية قوية مركبة من هيدروكسيد الكالسيوم (calcium hydroxide) وسلفيت الصوديوم، كما وتضاف أنزيمات البروتياز الثابتة في الوسط القلوي (مثلاً، المأخوذة من *Bacillus alcalophilus*). وفي ما عدا العملية التالية، تجري إزالة المواد القلوية عن الجلد بإضافة أملاح الأمونيوم أو أحماض عضوية. تساعد أنزيمات بنكرياسية، وكذلك أنزيمات بروتياز معتدلة أو قلوية، بكتيرية أو عفنية، في إزالة البروتينات غير الكولاجينية المتبقية، وتخلخل الكولاجين للصباغة. كما وتستخدم أيضاً أنزيمات البروتياز العفنية لخلخلة الجلود المعالجة بالكروم (chromium) (ما يعرف بالأزرق الرطب). إن المحاولات الرامية إلى دمج مراحل النقع والتكليس والدباغة في عملية واحدة تقوم على معالجة أنزيمية مكثفة، لم تلق بعد قبولاً في مجال الصناعة، بالرغم من تخفيضها لعدد مراحل العمل وزمنها واستهلاك المياه بنسبة 50 ٪ تقريباً.

إزالة المواد الغروية من الأقمشة (Desizing of textiles). إن حياكة ألياف النسيج تُعرِّض خيوط السداة (wrap) واللُحمة (weft)[3] إلى شد ميكانيكي قوي. ولتجنب انقطاعها أثناء هذه المرحلة، تقوى عادة هذه الخيوط بالمواد الغروية. في أغلب الأحيان يستخدم النشاء كمادة غروية لأسباب تتعلق بالكلفة؛ حيث يلتصق بالخيوط بشكل جيد جداً، ثم يزال بسهولة بعد الحياكة وقبل المراحل التالية المتمثلة بالصبغ والتبييض والتقوية، وذلك بواسطة أنزيم الألفا ـ أميلاز (α-amylase) المأخوذ من بكتيريا الـ Bacillus. ويستخدم هذا الأنزيم أيضاً، بالإضافة إلى أنزيم السيلولاز في معالجة الأقمشة المغسولة باستخدام الحجارة (stone- washed textiles).

(3) السداة (Warp): ما مُد من خيوط النسيج طولاً، واللُحمة (Weft) ما نُسج عرضاً.



الأنزيمات المستخدمة في صناعة الجلود			
خطوة المعالجة	**pH**	**البروتينات المستهدفة**	**الأنزيمات**
1 نقع (تفكيك البروتينات، كشف القرنية، إضعاف الشعر)	7–9	بروتينات غير ليفية، شحوم	بروتياز مأخوذة من أعفان وبكتيريا، التريبسين (خلاصات بنكرياسية)
1 إزالة الشعر	10	الكيراتين	كيراتيناز ، بروتياز
1 تكليس	12.5	بروتينات غير كولاجينية	بروتياز مأخوذ من بكتيريا وأعفان، الإلاستيز
2 إزالة الكلس، تنظيف	8–9	بروتينات متبقية، خلايا دهنية	بروتيز مأخوذ من بكتيريا وأعفان، التريبسين (خلاصات بنكرياسية)
2 تخليل (تعزيز المرونة، تحسين الصبغ)	5–6	كولاجين	بروتياز مأخوذ من بكتيريا وأعفان، تريبسين (خلاصات بنكرياسية)
3 مرحلة "الأزرق الرطب"	6	الجلد المدبوغ بالكروم	بروتياز مأخوذ من أعفان



• إجراءات الحصول على أنزيمات تقنية جديدة

(Procedures for obtaining novel technical enzymes)

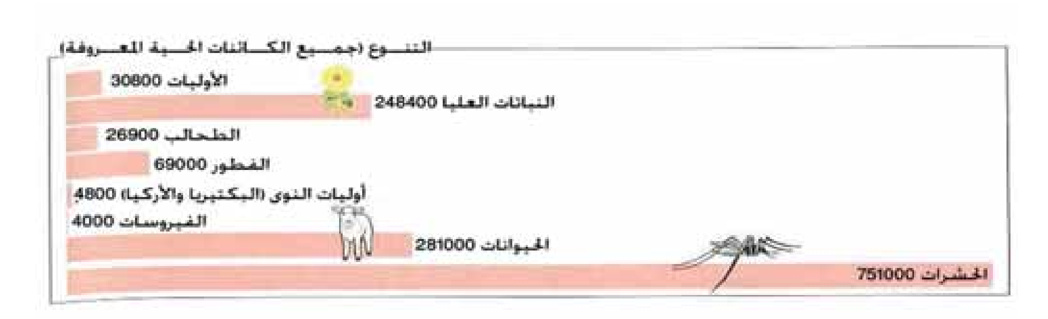
عموميات (General). لقد تسارعت عملية عزل أنزيمات جديدة بسبب تحسن إجراءات الغربلة (screening)، والتعبير (expression) في كائنات مضيفة يمكن التعامل معها بسهولة، بالإضافة إلى تعزيز الإنتاجية باستخدام التطفير (mutagenesis) والانتقاء (selection) أو تقانات الهندسة الوراثية. وعلى الرغم من هذا التقدم، لا يزال من النادر منافسة الأنزيمات لعمليات التصنيع العضوي. أحد أسباب ذلك هو توفر عدد قليل من الأنزيمات، التي تنفع مثلاً في عمليات تصنيع هامة مثل الربط التشاركي بين ذرات الكربون (C-C)، التي لا تتطلب عاملاً مساعداً باهظ الثمن؛ كالألدولاز (aldolases) مثلاً. من جهة أخرى، غالباً ما يكون الزمن اللازم لتطوير وتحسين عملية أنزيمية ما، طويلاً جداً مما لا يتناسب مع متطلبات الزمن القصير لإعداد بروتوكولات مطابقة لشروط ممارسة التصنيع الجيد (GMP) المطلوبة في الصناعات الدوائية والزراعية. تضم الأفكار الحالية لتحسين هذا الوضع 1) تصميم بروتينات بشكل منطقي، 2) التطور الموجه (directed evolution، و3) إجراءات غربلة جديدة مناسبة أكثر لزيادة التنوع الطبيعي المرتفع للمحفزات الحيوية (biocatalysts).

مواطن جديدة (Novel habitats). تتأقلم الكائنات الحية مع مواطن متنوعة جداً (أماكن بيئية)، وهي عادةً ما تطوِّر أنزيمات تناسب تماماً البيئة الموجودة فيها. تتمتع الكائنات المجهرية بشكلٍ خاص بإمكانيات تأقلم متعددة الجوانب في مواطن تُظهر مجالاً واسعاً من قيم الرقم الهيدروجيني (pH) ودرجات الحرارة وضغط التناضح وشروط أخرى. إن إجراء غربلة منهجية شاملة في مواطن غير اعتيادية مثل البيئات عالية الحموضة أو القلوية، والصحارى، ورواسب أعماق البحار، والينابيع الحارة على سطح الأرض أو في أعماق المحيطات سمح بالتعرف على عدد كبير من الكائنات المجهرية غير الاعتيادية وبعزل أنزيمات جديدة. فعلى سبيل المثال، تم عزل الأنزيم الثابت حرارياً DNAse I المستخدم في معظم تفاعلات البوليمراز التسلسلي (PCR) (التاك بوليميراز (taq polymerase)) من نوع من الكائنات الأولية النواة (prokaryotic) المحبة للحرارة (thermophilic)، وهو بكتيريا *Thermus aquaticus*، التي تم عزلها لأول مرة من نبع الماء الحار المسمى أولد فيثفول (Old Faithful)، في حديقة الحجر الأصفر بكاليفورنيا الذي تبلغ حرارته 90ºC. كما أمكن عزل كائن مجهري غير معروف حتى الآن من منفذ ماء حار في البحر المتوسط على عمق 1500m ينتمي إلى مجموعة الـ *Archaea*. وبسبب هذه الشروط البيئية القصوى المحيطة، تُظهر أنزيمات بوليميراز الـ DNA المعزولة من هذا النوع خصائص أفضل من ناحية أمانة التضاعف مقارنةً حتى بالأنزيم المستخلص من الـ *Thermus*؛ حيث أصبح بعض منها متوفراً تجارياً (مثل، بوليميراز ـ Pfu وبوليميراز ـ Tma).

طرائق غربلة جديدة (Novel screening methods). إلى جانب طرائق الغربلة التقليدية، أصبح تعديل الأنزيمات من خلال التصميم البروتيني أو التطور الموجه (directed evolution) أداة فعالة لأمثلة الأنزيم من أجل التطبيق التقني المقصود. لقد أتاح التطور الموجه بشكلٍ خاص أقلمة الأنزيمات بسرعة مع الحرارة المرغوبة، أو الرقم الهيدروجيني (pH)، أو المذيب العضوي أو المركب الأولي (substrate) المنشود.

كما أن فيض المعلومات الناجم عن سَلسَلة الجينوم وتحليله بأدوات المعلوماتية الحيوية (bioinformatics)، قد كشف أيضاً عن إمكانية التعرف على أنزيمات جديدة. فالتزايد المستمر في عدد الجينومات المسَلسَلة بشكل كامل سمح بالتعرف على آلاف الأنزيمات بسبب بصمتها الوراثية (التسلسلات الإجماعية (consensus sequence)، كالمعروفة من أنزيمات ذات وظائف متشابهة). هذه الأنزيمات يمكن عزلها بسهولة باستخدام تقانات تفاعل البوليمراز التسلسلي (PCR) أو مسابر التهجين (hybridization probes) لتجميع البصمات الوراثية بشكلٍ مناسب، غير أن البحث عن مركبها الأولي الطبيعي يمكن أنْ يكون عسيراً.

لقد أمكن من خلال تحليل تسلسل DNA العينات المعزولة من التربة التي تشفر لمناطق محفوظة في الجزء 16S أو 23S من الـ RNA الريبوزومي، استنتاج أقل من 1٪ من جميع الأنواع الميكروبية التي تم زرعها وتصنيفها حتى الآن. ولتجاوز هذه العقبة، تم بنجاح وضع طرائق لعزل أنزيمات جديدة من ميكروبات غير مزروعة وذلك بعزل الـ DNA من التربة، ثم قطعه بأنزيمات الحصر (restriction enzymes)، والتعبير عنه في كائن حي مضيف مناسب، وبعد ذلك استخدام معايرات مناسبة عالية الكفاءة للبحث عن الفعالية الأنزيمية المرغوبة. وبالرغم من عدم نضج هذه الطرائق تماماً، إلا أنها أتاحت حتى الآن كشف وعزل أنزيمات جديدة ذات خصائص غير اعتيادية.



خصائص مختلف أنزيمات الـDNA بوليميراز				
نوع النهاية	فعالية أنزيم الاقتطاع الخارجي '5-->' 3	فعالية أنزيم الاقتطاع الخارجي '3-->'5	زمن نصف العمر عند 95°C (دقيقة)	المنشأ
3'A	موجود	غير موجود	40	*Thermus aquaticus*
3'A	موجود	غير موجود	20	*Thermotoga maritima*
غير محدد	غير موجود	موجود	120<	*Pyrococcus furiosus*
>95% نهاية غير ناتئة	غير موجود	موجود	1380	*Thermococcus litoralis*

تنوع الليباز (بنى كونولي (Conolly) والتسلسلات الإجماعية)

Candida antarctica B
(S = serine في الموقع الفعال)
– TWSQG –

0,5nm

13

Ser

Rhizomucor miehei
– GHSLG –

18

Ser

Candida rugosa
– GESAG –

Ser

الاستراتيجيات نحو أنزيمات جديدة

غربلة الأنزيمات

التصميم المنطقي

التطور الموجه

عزل الـDNA من مواطن غير عادية

كلونة (إختيارية)

طريقة تحضير

التعبير في الكائن المضيف

الغربلة حاسوبياً (in silico) (بيانات التسلسلات)

تطبيق تقني

إجراء تقليدي

DNA من رواسب ، عينات تربة، رسابات ... الخ

الهضم الحصري إلى شدف DNA ذات الحجم المطلوب

التعبير في كائن مضيف في E.coli ،Streptomyces وآخرون

المعايرة لإنتقاء العينات الناجحة

تقانات خميرة الخباز والخلية المنفردة

خميرة الخباز والخمائر العلفية
(Bakers' yeast and fodder yeasts)

عموميات (General). يرجع تحضير العجين من الدقيق إلى فجر التاريخ، كما هو موثق في الحضارة المصرية على ألواح الطين التي تشير إلى صناعة «خبز البيرة» باستخدام الشعير الرطب المخمر بواسطة الخميرة. حتى القرن 19، كان الخبازون في أوروبا يستعملون خميرة البيرة أيضاً لصناعة الخبز، التي كان يتم الحصول عليها إما عن طريق «العملية الهولندية» (حوالى عام 1750)؛ القائمة على ترشيح الهريس (سائل التخمر) العكر، أو «العملية النمساوية» (حوالى عام 1800)؛ بقشد الخميرة من أوعية التخمر. حوالى العام 1870 اكتشف لويس باستور (Louis Pasteur) في فرنسا إمكانية إنتاج خميرة الخباز (*Saccharomyces cerevisiae*) بعطاءٍ مرتفع متصاحب مع القليل من الإيثانول (ethanol) وذلك بتأمين تهوئة قوية. وهكذا منذ ذلك التاريخ أصبحت تنتج الخميرة في أوعية مخفوقة ومهواة، بحيث يستعمل المولاس (molasses) بصورة أساسية كمصدر للكربون. أما أولى العمليات التي تم فيها تطوير إنتاج خمائر الأعلاف فكان عام 1930 بهدف تحقيق اكتفاء ذاتي. إلا أنه ظهرت في الفترة ما بعد الحرب قوى جديدة تقود لردم «الخلل البروتيني» («protein gap») بين الأمم المتطورة والنامية.

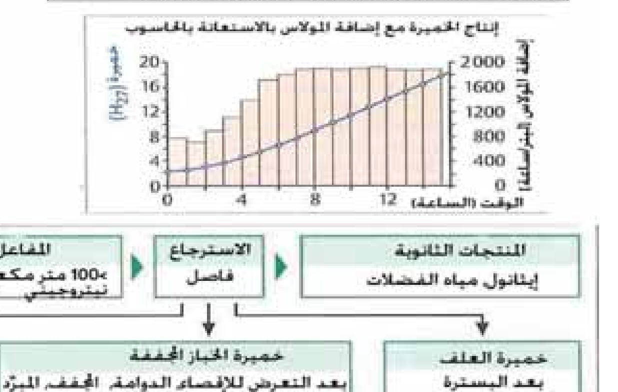
تخمير المواد الخام (Fermentation raw materials). نظراً إلى سعره المناسب وارتفاع محتواه من السكر، والنتروجين، والفيتامينات، والمعادن، أصبح المولاس (من القصب أو الشمندر السكري) مادة أولية هامة في إنتاج الخميرة. فهو يبقى بعد استخلاص قصب السكر أو الشمندر السكري المفروم بالماء الساخن بحيث يحتوي على 40 ـ 50٪ ساكاروز (saccharose)، والذي يحلله أنزيم الخميرة الإنفرتاز (invertase) إلى غلوكوز (glucose) وفركتوز (fructose) اللذين يمكن للخميرة أيضهما (metabolized).

التقانة (Technology). للحصول على مكافئ عطاء (Y_s) مرتفع، وبذلك تحويل المولاس (molasses) إلى كتلة خلوية من الخميرة، هناك عاملان هامان: التهوئة القوية خلال التخمير لإعاقة تشكل الإيثانول (ethanol)، والمراقبة الدقيقة لتركيز الغلوكوز في الوسط. فإذا زاد تركيز الغلوكوز على $100mgL^{-1}$، فإن التنفس ينخفض حتى بوجود تراكيز مرتفعة من الأكسيجين، كما يتشكل الإيثانول (كبح الهادم، «تخمر هوائي» «تأثير Crebtree»). نتيجة لذلك، تستخدم إجراءات التخمير الحديثة نظم تهوئة وتحريك مثالية ونظم تغذية بالمولاس مبرمجة بالحاسوب. ينتج في العملية المؤمثلة هذه $1kg\ H_{27}$ من الخميرة لكل 1kg مولاس. والـ H_{27} هي قيمة نسبية تستعمل لحساب العطاءات في صناعة الخميرة، على اعتبار أن الخميرة المضغوطة تحتوي 27٪ وزناً جافاً. وبسبب أن المولاس يحوي حوالى 50٪ سكر وأن عطاء الخميرة العائد من استهلاك السكر كمركب أولي (substrate) يبلغ 54g وزن جاف لكل 100g سكر، فإن عطاء الخميرة هو $1kg\ H_{27}$ لكل 1kg مولاس. تقليدياً، قادت إجراءات الإنتاج إلى تصنيع خميرة مضغوطة محدودة الثباتية أثناء التخزين، مما استوجب إنتاجها في أماكن محلية من أجل التوزيع. أما اليوم، فتجفف الكتلة الخلوية في مجفف الدوّامة لإعطاء خميرة الخباز الجافة التي تكون ثابتة لعدة أشهر، ومن الممكن إعادة تنشيطها بالماء والسكر خلال دقائق، وهذه ميزة مهمة ومناسبة للخبازين الذين يبدأون عملهم منذ الصباح الباكر.

خمائر العلف (Fooder yeasts). وهي تنافس المواد الأخرى الغنية بالبروتين مثل دقيق السمك ودقيق الصويا بشكلٍ خاص وذلك من حيث السعر. وبالتالي، إن سعر المصدر الكربوني هو عامل حاسم في منافسة عملية تصنيع الخميرة العلفية. لقد تمت دراسة أقسام من منتجات النفط، والغاز الطبيعي، والإيثانول (ethanol)، والميثانول (methanol)، والسيليلوز (cellulose)، ونصفي السيليلوز (hemicelluloses)، والنشاء ومصل اللبن كمصادر كربون؛ حيث أبدى العديد منها نجاحاً من الناحية الاقتصادية. وعليه، جرى تطبيق كل من عملية Symba التي تعتمد على نشاء البطاطا وعلى خميرتي *Endomycopsis fibuliger* و *Candida utilis*، وعملية Hovis McDougall التي تعتمد على الفطر *Fusarium graminearum* التي تقوم أيضاً بتحويل الغلوكوز إلى غذاء صحي منخفض السعرات الحرارية Quorn. هناك مصدر آخر للكربون يتمثل في سائل السلفيت Sulfite liquor المُستهلك الذي يبقى بعد استخلاص شرائح الخشب خلال صناعة عجينة الورق (pulp)، وهو يحتوي على حوالى 4% من عديدات السكر (polyoses). إضافةً إلى هذه العمليات التي سبق ذكرها المستخدمة في إنتاج خمائر العلف، فإنه يوجد أيضاً عملية Pekilo الفلندية، التي تستعمل الفطر *Paecilomyces variotii* وعملية Waterloo الكندية، التي تستعمل الفطر *Chaetomium cellulolyticum* ومخلفات الزراعة والغابات كالقش، أو التفل (قصب السكر)، أو السماد الحيواني، أو نشارة الخشب كمصادر للكربون.



الإجراء*	الخميرة H_{27}* [kg]	إيثانول [L]
A الإجراء الهولندي (حتى ~1850)	6-3	30-25
الإجراء الفيلي (Vienna) (حتى ~1915)	14	25
إجراء كوين هاغن (من سنة 1877)	20	20
B إجراءات التغذية المغذاة الحديثة	تصل حتى 85	1>
*في الإجراءات الحديثة، يتشكل 27kg كتلة خميرة مجففة (خميرة H_{27}) من 100kg مولاس		

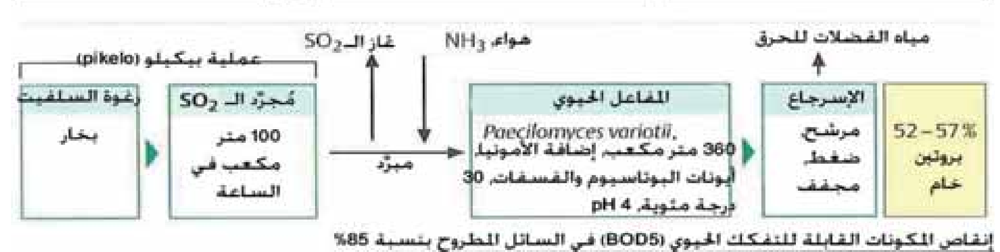


المزرعة التحضيرية: "الخميرة الأم" ◄ المفاعل الحيوي: 100< متر مكعب مولاس، مصدر نيتروجيني ◄ الاسترجاع: فاصل ◄ المنتجات الثانوية: إيثانول مياه الفضلات

- الخميرة H27 المضغوطة: من المرشح التفريغ
- خميرة الخباز المجففة: بعد التعرض للإقصاء الدوامة، المجفف المبرّد
- خميرة العلف: بعد البسترة

خمائر العلف

المادة الخام	الخمائر والفطور	الملاحظات
نشاء البطاطا	*Endomycopsis fibuliger*، و *Candida utilis*	عملية سيمبا (Symba)، السويدية. تفكك *E.fibuliger* النشاء، أما *C.utilis* فتتم أسرع وتتشكل الكتلة الخلوية من الغلوكوز
مصل اللبن	*Kluyveromyces fragilis*	لتنظيف مياه الفضلات الناتجة من معامل لألبانوالأجبان. يحتوي الناتج على بقايا من الخميرة والمصل
سائل السلفيت المُستهلك	*Saccharomyces cerevisiae* ، *Candida utilis* ،*Paecilomyces variotti*	يتم أيض ثمالات السكريات السداسية بواسطة S.cerevisiae، والسكريات الخماسية بواسط C.utilis عملية بيكيلو (Pekilo)، الفنلندية: تتواصل العملية لإنتاج الخمائر العلفية من سلفيت فضلات العجن.
غلوكوز منقى	*Fusarium graminearum*	عملية رانكهوفيس مكدوغال (Rank Hovis McDougall)، المملكة المتحدة؛ إستخدام النسيج الليفي للميسيليوم الفطرية كـ'بروتين فعال وظيفياً)



بروتين وزيت الخلايا المنفردة

(Single cell protein, single cell oil)

عموميات (General). بعد الحرب العالمية الثانية، قاد التقدم التقني في الكيمياء البترولية وتقانة التخمير إلى فكرة تطوير بروتين الخلايا المنفردة (SCP) عن طريق التخمير. وهو ما سوف يساعد في ردم فجوة تأمين البروتين بين الفقراء والأغنياء في العالم في وقتٍ تتزايد أعداد البشر بشكلٍ مطرد. وكذلك، خلال الحرب وكرد على الحصار البحري للحلفاء الذي أوقف كلياً استيراد الزيت النباتي من آسيا والأمريكيتين، تم اكتشاف زيت الخلايا المنفردة (SCO) في ألمانيا.

بروتين الخلايا المنفردة: المواد الخام والكائنات المجهرية. يمكن للخمائر مثل *Candida tropicalis* و*C.bombicola* أن تنمو على الألكانات (alkanes) التي تتم أكسدتها طرفياً (terminally oxidized) ضمن البيروكسيزوم (peroxisomes) إلى أحاديات أو ثنائيات أحماض الكربوكسليك (mono dicarboxilic acids)، ليجري فيما بعد أيضها (metabolize) بشكل إضافي. وعلى أساس هذه الملاحظات، جرى بكثافة، في الأعوام ما بين 1965 و1975، استكشاف استعمال المكونات البترولية ذات درجة الغليان المرتفعة كمصدر كربوني لتشكيل بروتين الخميرة. إلا أنه ونتيجة لكارثتي النفط فقد تم استبدال النفط تدريجياً بالميثانول، وهو المصدر الكربوني الذي يمكن أن يُؤخذ من قبل مدى واسع من البكتريا المحبة للميثايل ـ ميثايلية التغذية ـ (methylotrophic)، والخمائر مثل *Hansenula polymorpha* و*Pichia pastoris* و*Candida boidinitii* و*Methylophilus methylotrophus* و*Methylomonas clara*. في هذه الكائنات يبدأ أيض الميثانول بالأكسدة إلى الفورمالدهيد الذي يدخل بدوره في مسار فوسفات السكر الخماسي الأيضي (pentose phosphate pathway)، كما يمكن أن يؤكسد إلى CO_2 من خلال حمض الفورميك (formic acid) لإعطاء مكافآت اختزالية.

كتلة خلايا الخميرة من الألكانات (Yeast cell mass from alkanes): إن الألكانات ذات درجة الغليان المرتفعة هي قليلة الذوبان بالماء، ومع ذلك فإنه يجب أن لا تضاف المستحلبات (emulsifiers) لإمكانية تدخلها في المنتج الصادر عن الخميرة أو أن تؤدي إلى تشكيل الرغوة خلال التخمير. لذلك تعتبر أمثلة التهوئة ونظام التحريك الميكانيكي ذات أهمية مفتاحية في تطوير العملية. فحيث إن مستوى التهوئة في هذه العملية مرتفع (10 vvm نتيجة للحاجة إلى 16 mol من الـ O_2 لكل 1 mol من الهيكساديكان (hexadecane)) فإنه يجب السيطرة على تشكل الرغوة بعناية. ولهذا تم استخدام خلاطات مازجة (Intrming stirrers) ومفرقات الرغوة الأوتوماتيكية في كل من المفاعل الحيوي الموجود في Grangemouth في المملكة المتحدة الذي تبلغ سعته $40m^3$، والمفاعل الحيوي في سردينيا (Sardinia) الذي تبلغ سعته $100m^3$. ومع تطبيق نظام زرعة الدفعة المغذاة في عملية التخمير لمدة 5 أيام فإنه يتم إنتاج 0.9 kg من خميرة *Candida tropicalis* الرطبة في الـ 1 kg من الألكان؛ التي يتم استرجاعها باستعمال الفاصلات. ونظراً إلى كون ارتفاع محتوى الـ RNA في المنتج حرجاً ودقيقاً بالنسبة إلى التغذية، فإنه يخفض بالتحلل الذاتي الدقيق، كما تُستخدم مجففات الدوّامة التي تثبت الخميرة تمهيداً للنقل.

العمليات المرتكزة على الميثانول (Methanol-based processes). يمتلك الميثانول درجة غليان منخفضة (64.5°C) وهو سام حتى بالنسبة إلى الكائنات المجهرية المتغذية عليه (metholotrophic) لدى تراكيز أعلى من $100\ mgL^{-1}$. إلا أنه ولدى استعمال مخمر ضيق وطويل محمول هوائياً (ICI Billingham، (UK: 8x60 m) بالإضافة إلى أكثر من 600 صمام مضبوط حاسوبياً، تمّ التمكن من السيطرة على توزيع الميثانول، كما تمّ تعزيز ذوبانه نتيجة للضغط الهايدروستاتي ـ ضغط توازن الموائع ـ (hydrostatic) المرتفع. لقد تم الحصول على معدل المطلوب من التهوئة المرتفعة عن طريق النظام الحلقي (loop)، كما أفضت العملية المستمرة لمدة يومين إلى إنتاج 0.5kg من الكتلة الحيوية لكل 1kg من الميثانول وذلك باستعمال البكتيريا *Methylophilus methylotrophus*. أما بالنسبة إلى فصل الكتلة الخلوية فقد تحقق باستعمال الفاصلات، وجرى تخفيض محتوى الـ RNA بالتحلل الذاتي الدقيق، بالإضافة إلى استعمال مجفف الدوامة لجعل المنتج البروتيني ثابتاً للنقل.

القبول والاقتصاديات (Acceptance and economics): لقد جرى انتقاد استعمال خمائر الألكان (alkane) كغذاء على نحو سريع بسبب إمكانية تخصيب إنتاج المركبات المسرطنة عديدة الحلقات العطرية (polyaromatic) من النفط. وعلى الرغم من أن دراسات السمّيّة المتعمقة لم تدعم وجهة النظر هذه، لكنه اقتصر تسجيل هذه الخمائر في عام 1974 على استعمالها كإضافة في أعلاف الحيوانات البيتية. كما قادت في النهاية زيادة أسعار النفط خلال كارثتي النفط إلى وقف هذه المشاريع. أما بالنسبة إلى إدخال الكتلة الحيوية المشتقة من الميثانول (methanol) إلى السوق، فلم يترافق مع هذه الصعوبات، وذلك لاعتبارها منذ البداية كإضافة علفية. وعلى كل حال، فإن ارتفاع أسعار الميثانول ودعم الدول الأوروبية الحليب المجفف كبروتين علفي جعل هذه العملية أيضاً غير مجدية من الناحية اقتصادية.

زيت الخلايا المفردة (Single cell oil): يمكن الحصول على الزيت من الخمائر المستخدمة للغلوكوز مثل *Rhodotorula glutinis* أو من الفطريات مثل *Mortierella isabellina*، حيث تمتّ الإفادة من عطاءات زيت تفوق الـ 60٪ من الكتلة الخلوية الجافة. إلا أن تركيبها من الشحوم الثلاثية مشابه لذلك الموجود في الدهون النباتية، وبالتالي فإنها لا تمتلك أية ميزة اقتصادية في السوق العالمي المفتوح.

بروتين الخلايا المفردة		
المصدر الكربوني	الكائنات المجهرية	المشاكل
ألكانات عالية درجة الغليان	*Candida lipolytica ,Candida tropicalis*	صعوبة العزل (نظراً إلى تشكّل المستحلبات)، ثمالات الزيت، الطعم، قبول المستهلك.
الميثان	*Methylococcus capsulatus*	استهلاك الأوكسيجين المرتفع، عملية طاردة للحرارة بشكل قوي، (تتطلب تبريد)، خطر الانفجار
الميثانول	*Hansenula polymorpha ,Pichia patoris ,Candida boidii , Methylophilus methylotrophus*	المحتوى العالي من الـRNA

مكونات (%) دقيق الصويا والحليب المجفف مقارنة ببروتين الخلايا المنفردة

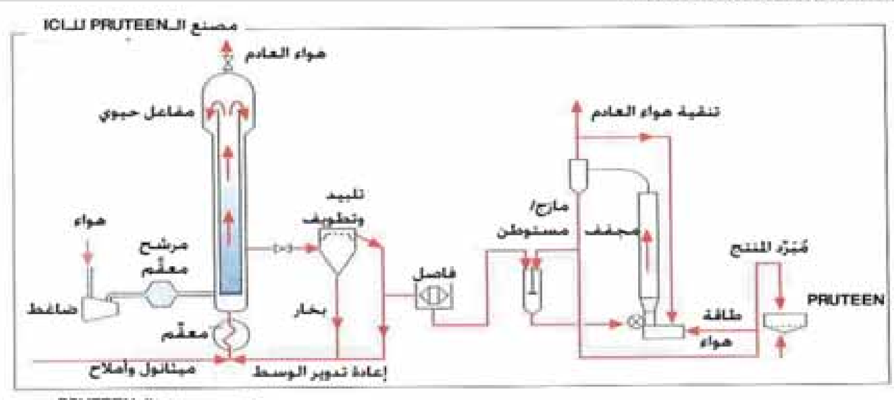
المنتج من بروتين الخلايا المنفردة	البروتين الخام	الأحماض الأمينية	الدسم	الأحماض النووية	الأملاح، الماء
توبرينا (TOPRINA (BP))	60	54	9	5	10
بروتين (PRUTEEN (ICI))	83	65	7,4	15	10
دقيق الصويا	45	40	2	–	18
مسحوق الحليب كامل الدسم	25	–	27	–	10

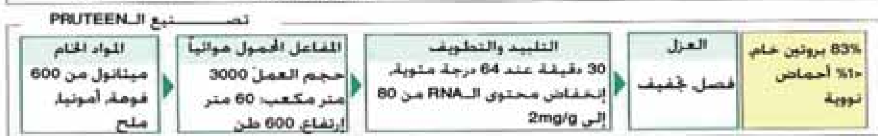
عطاءات بروتين الخلايا المفردة (الوحدات التجريبية ووحدات الإنتاج)

الكائن المجهري	مصدر الكربون، الأيض	Y_s*	الإنتاجية [kg/L في الساعة]
Candida lipolytica (TOPRINA)	ألكانات(alkanes)	0.95	2
Mthylophilus methylotrophus (PRUTEEN)	ميثانول،RMP	0.53	10-8
Candida utilis	إيثانول	0.8	4.5
Saccharomyces cerevisiae (خميرة الخباز)	مولاس، FDP	0.85	5.2
Paecilomyces variotii	رغوة السلفيت،FDP	0.6	2.7

*غرامات الوزن الجاف الخلوي/ غرامات المصدر الكربوني

RMP: مسار الرايبولوز أحادي الفوسفات (ribolse monophosphate pathway)، FDP: مسار الفروكتوز ثنائي الفوسفات (fructose diphosphate pathway)





• المعالجة الهوائية لمياه الفضلات

(Aerobic waste water treatment)

عموميات (General) . أُدخلت المعالجة الهوائية لمياه الفضلات منذ حوالى المئة عام باستخدام مرشحات الجريان المتقطع[4] (trickling filters) وأحواض التهوئة. وتعالَج اليوم، في غالبية البلدان الصناعية، جميع مياه الصرف الصحي تقريباً معالجة بيولوجية قبل أن تصب في المياه السطحية.

تركيب مياه الفضلات (Wastewater composition) . إن تركيب مياه الفضلات المنزلية يختلف عن تركيب مياه الفضلات الصناعية. فبالرغم من أن هذه الأخيرة تختلف باختلاف نوع الصناعة المخلفة لهذه المياه، إلا أنه، وبشكل مدهش، فقد تبين أن تركيب مياه الفضلات المنزلية هو ثابت، وذلك بعد إنشاء معدل مركبات مياه الفضلات المنزلية خلال عدة فترات متباينة. تحوي مياه الفضلات المنزلية حمولة عضوية قدرها 60g BOD_5 للنسمة الواحدة في اليوم («بدل النسمة» «Inhabitant Equivalent»)؛ حيث يتم قياس الـ BOD_5 (وهو الطلب على الأكسيجين الكيميائي الحيوي Biochemical Oxygen Demand) بعد خمسة أيام) بقياس استهلاك الأكسيجين من خلال إجراءات مقايسة. وإضافةً إلى معيار الـ BOD، هناك معايير أخرى هامة مثل الـ COD (الطلب من الأكسيجين الكيميائي (Chemical Oxygen Demand)) والـ TOC (الكربون العضوي الإجمالي (Total Organic Carbon)) اللذين يتم تحديدهما عن طريق الأكسدة الكيميائية لعينة مياه الفضلات، وبالتالي يكونان ممثلين للحمولة العضوية الإجمالية، وكذلك للمكونات غير العضوية القابلة للأكسدة في العينة. في الواقع، هناك الكثير من مياه الفضلات التي هي مزيج من المصدرين المنزلي والصناعي.

الجوانب الخاصة بالأحياء المجهرية (Microbiological aspects) . يوجد في رسابة (sludge) محطة المعالجة الهوائية (aerobic treatment) لمياه الفضلات أنواع عديدة من الكائنات المجهرية، والطحالب (algae)، والأوليات (protozoa) التي تكوِّن بيئة تعايشية مصغرة (جماعة حيوية (biocenosis)). وفي حالة كون مياه الفضلات المعالَجة هي ذات مصدر منزلي فقط فإن هذه المجموعات تكون ثابتة لفترات زمنية طويلة، كما يمكن لإضافة مياه الفضلات الصناعية أن تغير من تركيب هذه المجموعات بشكل كبير. مؤخراً، أصبحت الزرعات البادئة للرسابة والمتخصصة في أكسدة بعض مكونات الفضلات الصناعية متوفرة، مما يساعد في تنقية مياه الفضلات الصناعية.

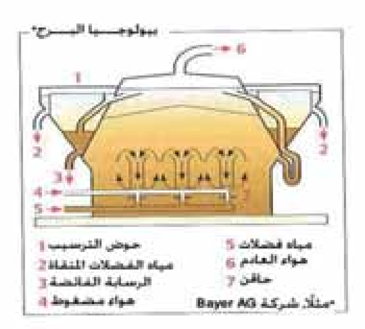
عملية الترشيح بالجريان المتقطع (Trickling filter process) . يتم في هذه العملية ترشيح مياه فضلات، سبق معالجتها ميكانيكياً، عبر برج مملوء بمواد ذات حجم كبير مثل الحجارة البركانية. ينتج من ذلك، تشكل مجموعات الرسابة على سطح هذه المواد، ما يؤدي إلى أكسدة مكونات مياه الفضلات على نحوٍ مستمر. إن قدرة الأكسدة لدى هذا النظام هي محدودة بانتشار الأكسيجين. لذلك، يتم إزالة الفائض من الرسابة بالضغط لتتم معالجتها لاحقاً لاهوائياً (anaerobic).

أحواض أو خزانات التهوئة (Aeration tanks) . ويجري فيها حجز مياه الفضلات في حوض مهوًّى يمكن مزجه بالتحريك. هذه التقانة غالباً ما تكون مفضلة على مراشح الجريان المتقطع (trickling filters) بسبب فعالية الأكسدة التي هي أعلى بحوالى خمس مرات، التي تعود إلى إدخال الهواء بشكلٍ فعال في العملية. كما ويمكن زيادة هذه الفعالية أكثر من خلال ضخ الأكسيجين عوضاً عن الهواء. في هذه العملية، تتم إزالة الرسابة (sludge) المتشكلة عند الوصول إلى حوض الترسيب لتُنقل بعد ذلك إلى عملية الهضم اللاهوائي (anaerobic digestion) . أما مساوئ هذه الطريقة فتتمثل بكون البناء الذي تتم فيه العملية مفتوحاً، مما يحدّ من إمكانية إدخال تعديلات على العملية ويساهم في إطلاق الروائح المزعجة للجوار. في بعض البلدان مثل ألمانيا، أصبحت المعالجة الثالثية لمياه الصرف الصحي طريقة معيارية (standard) تستخدم لإزالة الفوسفات (phosphate) والنيترات (nitrate)، حيث يعتبر الأول عاملاً مخثثاً (eutrophicate) (منضباً للأكسيجين في الماء) والثاني عامل خطورة في مياه الشرب. تتم إزالة الفوسفات بالترسيب أو من خلال عمليات بيولوجية، أما النيترات فمن خلال عملية بيولوجية قائمة على استخدام مجموعات بكتيرية قادرة على تشكيل النيترات (nitrifying) واختزاله (إزالة النيترات (denitrifying)).

بيولوجية البرج (Tower biology) . إذا توجب تنقية أحجام كبيرة من مياه الفضلات الصناعية، فإنه يمكن استخدام طريقة هندسية متقدمة تتضمن أبراج تخمير مغلقة. ففي تقانات تم تطويرها بواسطة هوكست (Hoechst) وباير (Bayer) في ألمانيا، تم استخدام أبراج ذات ارتفاع يصل إلى 30m، مزودة بمضخات للعمل في حلقة مغلقة. هذه الأبراج، يجري تعزيز التهوئة فيها من خلال أمثلة شاملة لطريقة التغذية بمياه الصرف ودفع الهواء، وهي تمتلك قدرة أكسدة تفوق تلك التي لدى أحواض التهوئة بخمسين مرة تقريباً، بالإضافة إلى احتجازها للروائح داخل النظام المغلق، وإمكانية إضافة مياه الفضلات المنزلية لتعزيز التفكيك الحيوي ككل.

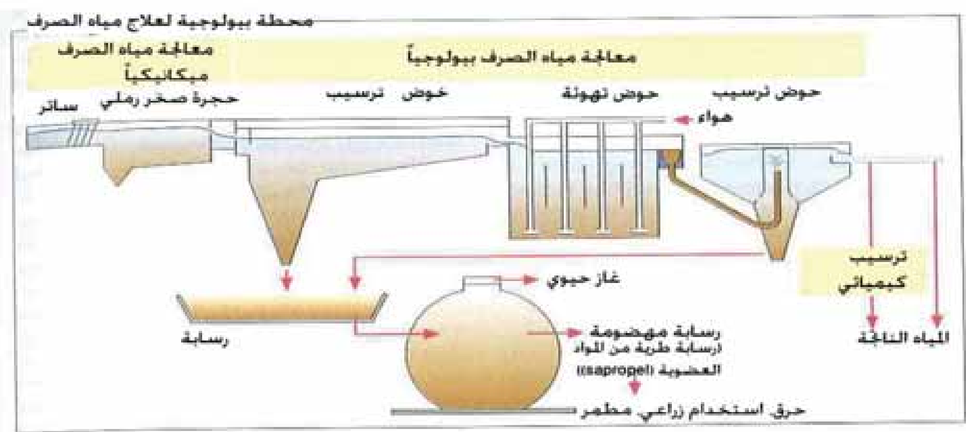
---

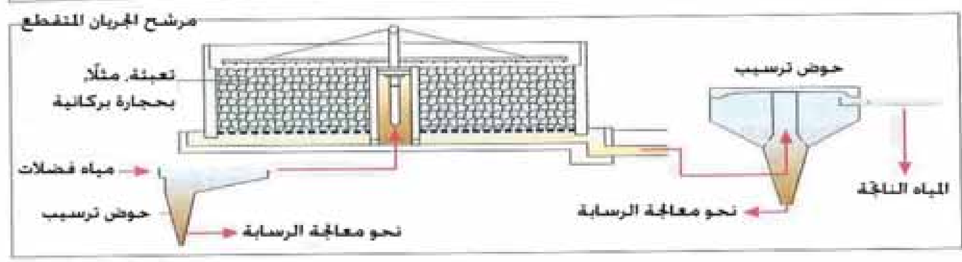
(4) مرشحات الجريان المتقطع (Trickling filters) عبارة عن فراش ثابت من الحجارة أو البحص أو الرغوة أو البولي أوريتان أو مواد بلاستيكية مختلفة. تمر عبرها مياه الصرف الصحي أو مياه الفضلات مؤدية لنمو طبقة لزجة ميكروبية تغطي حاملاً خاملاً يؤمن المعالجة الهوائية للمياه الملوثة. يطلق على هذه المرشحات أسماء مختلفة مثل المرشحات الخشنة أو المتقطعة أو البيولوجية.



مكونات مياه الفضلات		
المنشأ	معادل النسمة*	الملاحظات
مياه الفضلات المنزلية	1	لكل نسمة
مصانع البيرة	350–150	لكل 1000L بيرة
معامل الألبان (من دون إنتاج الجبن)	70–25	لكل 1000L حليب
معامل النشاء	900–500	لكل 1000 طن
الصوف	4500–200	لكل طن صوف
معامل الورق	900–200	لكل طن ورق
معامل السكر	2000–1000	لكل طن سكر

*معادل النسمة الواحد يساوي BOD_5 60g





بيانات البناء والأداء النموذجية			
	مرشح الجريان المتقطع	حوض التهوئة	بيولوجيا البرج
الارتفاع أو العمق(m)	4–2	6–3	30
القطر (m)	حتى 30	حتى 30	30
حجم العمل (m^3)	10~	100~	15000
وقت البقاء (ساعة)	4~	10–6	14
انخفاض الـBOD_5	0,5	2	100

• المعالجة اللاهوائية لمياه الفضلات وللرسابة

(Anaerobic wastewater and sludge treatment)

عموميات (General). تتعرض عادةً الرسابة المتشكلة أثناء معالجة مياه الفضلات هوائياً للإفساد اللاهوائي قبل حرقها أو طمرها أو استخدامها في الزراعة. إن هضم الرسابة لا هوائياً يشكل على الأرجح العملية الأكبر حجماً في التقانة الحيوية. ففي ألمانيا وحدها تُنتِج حوالى 5000 وحدة معالجة للرسابات بحجم إجمالي يبلغ $1000\,000\ m^3$، مئة مليون متر مكعب من الغاز الحيوي (biogas) سنوياً. كما يمكن لمياه الفضلات أيضاً أن تعالج لاهوائياً باستخدام مفاعلات القعر المسيَّل (Fluid bed reactors) اللاهوائية. لقد جرى في بعض البلدان النامية كالصين والهند توظيف عمليات إزالة الفضلات بالهضم اللاهوائي في منشآت صغيرة غير مركزية لإنتاج الغاز الحيوي (الميثان (methane)) كمصدر محلي للطاقة.

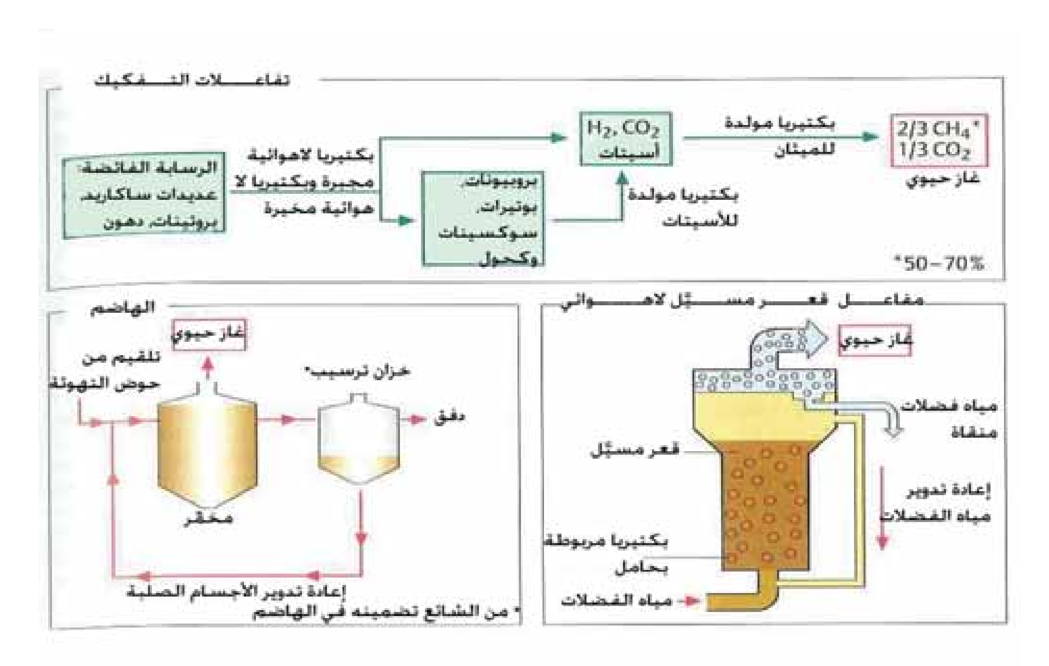
الجوانب الخاصة بالأحياء المجهرية (Microbiological aspects). يتشكل غاز الميثان (methane) من الرسابة (sludge) بفعل ثلاثة أنواع من المجموعات البكتيرية: (1) كائنات متنوعة من البكتيريا اللاهوائية إجبارياً أو اختيارياً (Clostridia، Enterobacteria، Streptococci) التي تفكك النشاء، والشحوم، والبروتينات إلى أحماض عضوية، وغاز الهيدروجين (H_2)، وغاز ثاني أوكسيد الكربون (CO_2)؛ (2) البكتيريا المولدة للأسيتات (acetogenic bacteria) التي تحول الأحماض الدهنية العليا إلى حمض الخل (acetic acid) وH_2 وCO_2؛ و 3) البكتيريا المولدة للميثان (methanogenic bacteria) التي تشكل الميثان و CO2من حمض الخل؛ حيث إن هذه الأخيرة هي سلالات لاهوائية إجبارياً، وعادةً ما تكون منتمية لـ Archaebacteria.

الجوانب التحليلية (Analytical aspects). تتمثل المعايير الأساسية لهضم الرسابة (sludge digestion) في اختزال الكربون العضوي (TOC، DOC أو COD)، وتشكيل الغاز الحيوي. يجري تحديد معيار الكربون العضوي الإجمالي (total organic carbon (TOC)) من خلال التصوير الطيفي بالأشعة ما تحت الحمراء (infrared spectroscopy) بعد أكسدة العينة بالبيرسلفات (persulfate)، كما يجري تحديد معيار الـ DOC مثل الـ TOC ولكن بعد الترشيح، أما بالنسبة إلى معيار طلب الأكسيجين كيميائياً (COD) فيحدَّد من خلال الأكسدة بثنائي الكرومات (dichromate) المتبوعة بالمعايرة (titration). وعليه، تمثل الطرق الثلاث هذه كمية الـ CO_2 المتشكل أو كمية الأكسيجين المستهلك اللازم لأكسدة العيّنة (التي هي هنا الرسابة) أو جزئها المنحل (DOC) كيميائياً وبشكل كامل إلى CO_2 وماء. أما الغاز الحيوي (biogas) فهو المنتج النهائي لهضم الرسابة لاهوائياً. وهو يتكون من الميثان والـ CO_2 بنسبة الثلثين إلى الثلث تقريباً مع آثار من غازات الهيدروجين والآزوت وكبريت الهيدروجين (H_2S) وغازات أخرى؛ بحيث يتم تحديد تركيبه عادةً بواسطة كروماتوغرافيا الغاز (Gas chromatography).

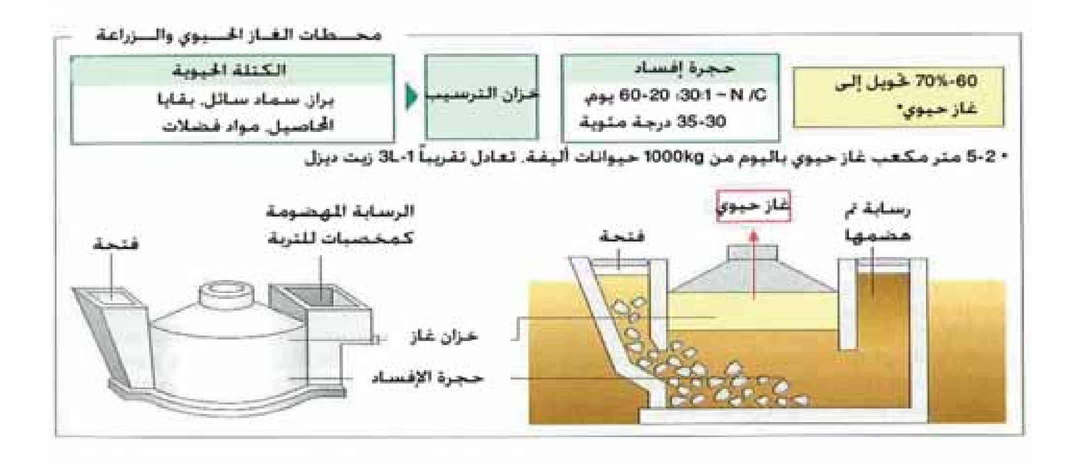
الجوانب التقانية (Technical aspects). إن المعالجة اللاهوائية لمياه الفضلات هي أبطأ بكثير (ذات زمن بقاء يقدر بحوالى عشرين يوماً) من المعالجة الهوائية. حيث إن المجموعة البكتيرية اللازمة لهضم الرسابة (sludge digestion) تتطور في حدود ضيقة من الرقم الهيدروجيني (pH) والحرارة، مما يستدعي رقابة شاملة لهذه المعايير. ومع ذلك، تكمن ميزة هذه الطريقة في التحول الشبه الكامل (أكثر من 90٪) للرسابة إلى غازي الميثان (methane) وثاني أوكسيد الكربون، مع تشكل كمية قليلة من الكتلة الحيوية وقليلاً من الروائح. إن الرسابة المعالجة المتبقية بعد عملية الإفساد اللاهوائية هذه يتم حرقها أو طمرها أو استخدامها في الزراعة كمادة مخصبة، كما أن محتواها من طاقة الغاز الحيوي (biogas) المنتَج يفوق الطاقة اللازمة لمحطة معالجة مياه الصرف الصحي بشكل كبير.

مفاعل القعر المسيَّل اللاهوائي (Anaerobic fluid bed reactor). يمكن لمياه الفضلات الحاوية على حمولة مرتفعة من بقايا عضوية قابلة للتفكك الحيوي (biodegradable) أن تعالج على نحو مفيد بطريقة المعالجة اللاهوائية للرسابة (sludge)، أي بدون أكسدة هوائية مسبقة. مثل هذه العمليات، يجري فيها استخدام مفاعلات الأبراج (tower reactors) حيث تتكتل المجموعات الميكروبية في أجزاء الرسابة إما من تلقاء نفسها أو بعد إضافة جسيمات كبيرة الحجم؛ التي تميل إلى الترسب بسبب كثافتها المرتفعة، مما يؤدي إلى إغناء الجزء الأسفل من البرج بالبكتيريا. وهي (أي هذه العمليات) تتم بكفاءة عالية، وذلك بسبب إضافة مياه الفضلات من الأسفل وتحقيق مزج إضافي لمحتوى العمود (البرج) نتيجة إطلاق الغاز الحيوي؛ الذي يجري فصله باستخدام فاصل غازي. كما أنه في بعض أنواع مياه الفضلات، مثل تلك الناجمة عن صناعة الورق أو السكر والنشاء، فإنه يتم اختزال الكربون العضوي الإجمالي (TOC) بنسبة تفوق الـ 95٪ مع إنتاج كمية ممتازة من الغاز الحيوي (biogas) في أقل من يوم حتى عندما تكون الحمولات مرتفعة.

الغاز الحيوي في البلدان النامية (Biogas in DC). في الصين وحدها، تستخدم أكثر من 7.6 مليون أسرة هاضمات غاز حيوي، التي باستطاعتها أن تولد 200 مليون متر مكعب من الغاز الحيوي في العام، وأن تؤمن كمية كافية من المخصبات الزراعية (الأسمدة) لإنقاص استهلاك الحطب بشكل هام. إن محطات الغاز الحيوي هي قائمة على تقانة بسيطة، حيث إنه غالباً ما يتم إنتاج الرسابة (sludge) من الكتل الحيوية الزراعية كالسماد، أو بقايا المحصول أو الفضلات المنزلية.



بيانات البناء والأداء النموذجية			
	هاضم تقليدي	الإفساد بالتماس	مفاعل القعر المسيّل
الارتفاع، الحجم (kg COD/m³ في اليوم)	حتى 30m، 16000m³	مستوى محطة تجريبية	حتى 20m، 2000m³
الحمولة	8-1	5-1	30-5
زمن بقاء السائل (يوم)	30-10	25-0.5	1.5-0.2
زمن بقاء الكائنات المجهرية (ساعة)	30-10	20<	100<
إنخفاض الـ COD (%)	70-30	90-60	90-80



• المعالجة البيولوجية لهواء العادم

(Biological treatment of exhaust air)

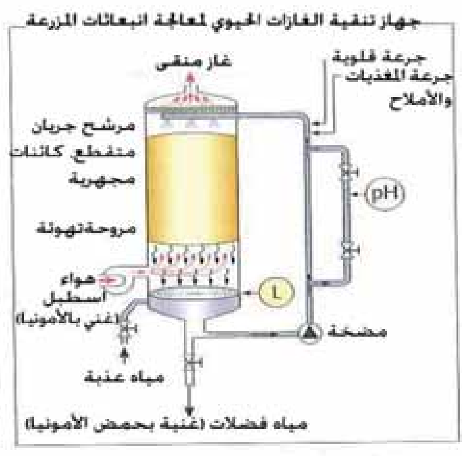
عموميات (General). مع التشريعات المتشددة والدائمة التي تتعلق بمراقبة التلوث وانبعاث الغازات، فإنه يتم استكشاف طرق جديدة للتخلص من المركبات الطيارة المنبعثة من العوادم مثل تلك المسببة للروائح. إن الكائنات المجهرية هي قادرة على تفكيك مثل هذه المركبات بعد امتصاصها في طور مائي. لذا فهي تستخدم في الغاسلات الحيوية (biowashers) لأكسدة المركبات المنحلة في الماء، وفي المراشح الحيوية لإزالة المكونات العضوية القليلة الانحلال في الماء الموجودة في الفضلات الغازية.

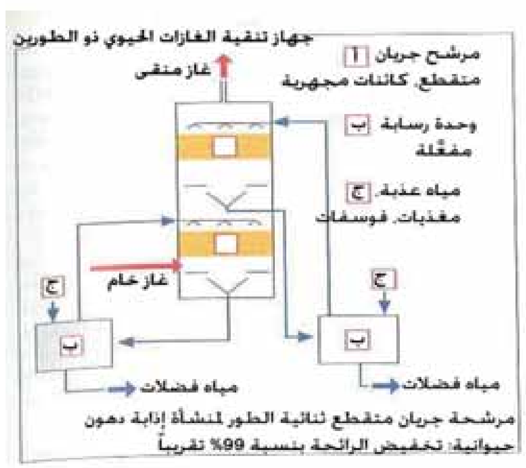
هواء العادم والغاز (Exhaust air and gas). يجري استخدام المراشح الحيوية (biofilters) منذ عقود عديدة لإزالة الروائح من بعض أجزاء محطات معالجة الصرف الصحي، وبشكلٍ خاص من الأجزاء التي تزيد من ثخانة الرسابة (sludge thickeners) أو من وحدات إزالة المياه في الهواضم اللاهوائية (anaerobic digesters). وقد تمت معالجة هواء عوادم محطات أخرى صناعية وزراعية أيضاً بنجاح مثل المصاهر، ومعامل الأغذية، ومزارع الدجاج والخنازير، والمسالخ. عادة ما تكون المكونات العضوية للروائح هي عبارة عن أحماض دهنية منخفضة، وأمينات (amines)، وميركابتان (mercaptans) (المنبثقة من معامل الأسمدة ومعامل إذابة دسم الحيوانات)؛ فينولات وأمينات منخفضة الوزن الجزيئي؛ ألدِهيدات وكيتونات (من المصاهر)؛ مركبات عطرية (من مصانع الطلاء)؛ وكذلك مواد نخالية (furfural) (من مصانع الأغذية). كما وتستخدم المراشح الحيوية أحياناً في تنظيف الترب التي تحتوي على كميات قليلة من المواد العضوية.

المرشحات الحيوية (Bifilters). وهي وحدات ذات بنية بسيطة في العادة. يستخدم فيها السماد ـ الكومبوست ـ (compost)، أو لحاء الشجر أو الخُث[5] peat) أو الأخشاب كحوامل تتصف بسطح واسع بالنسبة إلى الحجم. كما يضاف الرماد أو الأحجار البركانية للتخفيض من كثافة رصها. ولدى مرور غاز عادم رطب عبر مثل هذه المراشح، فإن مجموعات من الكائنات المجهرية تبدأ بالنمو وأكسدة مكونات الرائحة في غاز العادم العضوي. وكذلك أيضاً، يمكن للمواد العضوية الداعمة المكونة للمرشح الحيوي أن تتأكسد حيوياً بعد عدة سنوات من الاستخدام مما يؤدي إلى انخفاض أدائها وزيادة في هبوط ضغط الهواء المُرَشَّح. إلا أنه يمكن استرجاع كفاءة المعالجة باستخدام رصة جديدة من المرشح الحيوي؛ بحيث يمكن تمييز نوعين من المراشح الحيوية تبعاً للشكل الفيزيائي: مراشح وحيدة المستوى ومراشح متعددة المستويات.

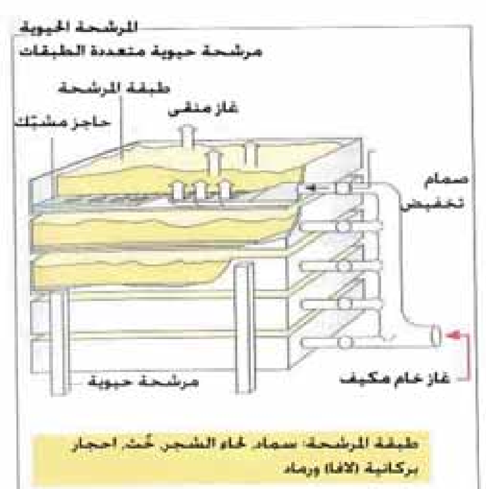
غاسلات الغاز الحيوية (Bioscrubbers). إن بناء هذا النوع من محطات المعالجة هو أكثر تعقيداً من بناء المراشح الحيوية (biofilters): فالمكونات العضوية للروائح يجري امتصاصها أولاً في طور مائي تم إغناؤه في أغلب الأحيان بمواد مغذية، ليتم لاحقاً أيضها (metabolized) في حوض التهوئة أو في مفاعل حيوي بواسطة كائنات مجهرية متأقلمة. وبسبب عملية إعدادها الثنائية الخطوة، فإنه من المطلوب مراقبة وضبط أداء المحطة بشكل أكثر دقة، مما يقود إلى أداء يفوق أداء المراشح الحيوية البسيطة نظراً إلى إزالة المستَقلبات السامة والمنتجات النهائية باستمرار. ففي حالة تنقية هواء عادم يحتوي على غاز كبريت الهيدروجين (H_2S)، يجري تحميض سريع عبر تزايد بكتيريا *Thiobacilli* في المجموعة الميكروبية التي تؤكسد غاز كبريت الهيدروجين إلى حمض الكبريت (H_2SO_4). كما تسمح غاسلات الغاز الحيوية المجهزة بمراقب للرقم الهيدروجيني (pH) بتعديل (neutralize) الحمض المتشكل مؤدية لزمن تشغيل مديد. إن استهلاك الطاقة في عمليات المعالجة هذه يظل منخفضاً بشكل واضح بسبب الكمية المحدودة للمياه المستهلكة. أما بالنسبة إلى المذيبات القابلة للتفكيك الحيوي (biodegradable solvents) بسهولة مثل الكحوليات المنخفضة، فيكون زمن بقاء الغاز العادم في الغاسل محدوداً بـ 1 ـ 2 دقيقة. بينما عند معالجة مزيج من مركبات قابلة للتفكيك الحيوي بسهولة وأخرى ضعيفة القابلية للتفكيك الحيوي، تستخدم غاسلات غاز ثنائية المرحلة، أو في أغلب الأحيان، كشكلٍ مندمج من مرشح الجريان المتقطع (trickling filter) والغاسل. فعلى سبيل المثال، يمكن أن يعالج غاز عادم منشأة البرنيق (lacquer) على مرحلتين، بحيث يعالج في المرحلة الأولى كل من الكحول والإستر القابلين للتفكيك الحيوي بسهولة، ثم يقوم بأيض المركبات الأقل انحلالاً في الماء والمركبات العطرية القابلة للتفكيك الحيوي مثل التولوين والكزايلين في المرحلة الثانية. إن إعادة تدويرهواء العادم الناتج من الإنتاج الحيواني الكثيف لا يفيد فقط في إزالة غاز ثاني أوكسيد الكربون وإعادة التزود بالأكسيجين، وإنما يفيد أيضاً في ضبط درجة الحرارة والتخلص من الجراثيم، وإزالة مكونات غاز العادم ذي الرائحة القوية، وبشكلٍ خاص الأمونيا؛ التي تتم إزالتها في الغاسل الحيوي، وذلك من خلال أكسدتها بواسطة بكتيريا النترتة (nitrifying bacteria) إلى نترات بحيث يُمتص حمض النيتريك في الماء كما يجري عدله (neutralized) واسترجاع الحرارة الناجمة بواسطة مبادل حراري. نموذجياً، يمكن تخفيض تركيز الأمونيا في هواء العادم إلى 2 ـ 4 جزء بالمليون (PPM)، وانقاص انبعاث الأمونيا إلى الجوار حتى 0.2kg للحيوان الواحد في السنة مقارنة بـ 5.3-5.6kg في زرعة لا تستخدم الغاسلات الحيوية.

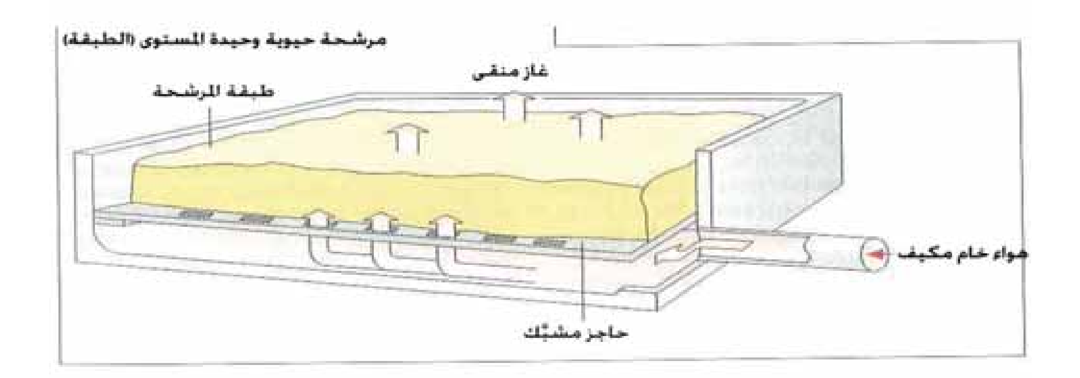
(5) نسيج نباتي نصف متفحم يتكون بتحلل النبات تحللاً جزئياً في الماء.





المصدر	المكونات الرئيسية	طريقة التنظيف
مكونات هواء العادم النموذجية		
مزرعة الحيوانات	أحماض دهنية دنيا، أمونيا	مراشح حيوية
انبعاثات صناعية	فينول	مراشح حيوية مع بكتيريا Pseudomonads
مصاهر	فينول، فورمالدهيد، أمينات، كيتونات	غاسلات حيوية
مفاعلات إذابة الدهون الحيوانية	أحماض دهنية دنيا	غاسلات حيوية
منشأة كيميائية	تولوين، أمونيا، ألدهيدات	مراشح حيوية أو غاسلات حيوية
هاضمات	كبريت الهيدروجين	غاسلات حيوية





• المعالجة البيولوجية للتربة

(Biological treatment of soil)

عموميات (General). تلعب مجموعات الكائنات المجهرية دوراً أساسياً في إقامة التوازن البيئي عبر تفكيك الكتلة الحيوية وتمعدن المادة العضوية. وبالرغم من استخدام هذه المقدرة منذ قرن تقريباً في معالجة مياه الفضلات، لكن دراسة إزالة تلوث التربة ميكروبياً (المداواة الحيوية bioremediation) بدأت فقط منذ حوالى عشرين سنة؛ وهي تنافس العمليات الكيميائية والحرارية، كما يمكن استخدام كائنات مجهرية مأشوبة فيها. تتضمن هذه العمليات ضخ مزارع ميكروبية في الموقع (مكان التلوث (*in situ*)) بالإضافة إلى تنظيف التربة بعد الحفر.

التلوث وبنية التربة (Contamination and soil structure). تُجمَع الملوثات الناجمة عن النشاط البشري في خمس زمر رئيسية: 1) الهيدروكربونات المعدنية (mineral hydrocarbons (MHC))، 2) بنزين، تولوين، كزايلين، وإيثيل البنزين (BTXE)؛ 3) الهيدروكربونات متعددة الحلقات العطرية (PAH)؛ 4) والهيدروكربونات المكلورة (CHC)؛ و5) ثلاثي النيتروتولوين (TNT)، في المناطق العسكرية. تعتبر مجموعتا الـ MHC والـ BTXE من المجموعات القابلة للتفكيك الحيوي على العكس من مجموعات الـ PAH والـ CHC ذات الكثافات العالية غير القابلة للتفكيك الحيوي. عند تقييم قابلية التفكيك الحيوي لهذه المركبات، يجب أن يؤخذ بعين الاعتبار تركيب التربة. فالتربات الرملية التي يمكن عبورها بيسر هي أسهل تنقية من التربات الطينية (الصلصالية). وبالنسبةإلى ـ TNT، حتى الآن، لا يمكن معالجته سوى بتثبيته عن طريق تطبيق خطوات متسلسلة لاهوائية وهوائية.

معالجة التربة في الموقع (in situ). في هذا النمط من التقانة، تضاف المغذيات والمزارع الميكروبية، ذات الفعالية العالية في التفكيك الحيوي التي سبق عزلها بعد تخصيبها بوجود الملوثات، بشكلْ محلول عبر آبار حقن؛ حيث تؤمَّن التهوئة وعملية التحويل بواسطة المياه الجوفية. وفي حالة كون التربة المعالجة مكونة بشكل رئيسي من طين وطفال[6] (loam) فإن تزويدها بالأكسيجين غير ممكن، وبذلك يجري استخدام النترات كقابلٍ للإلكترون. إلا أن التوازن البيئي لمثل هذه العمليات يبقى مشكوكاً في أمره بسبب إمكانية تلوث المياه الجوفية بالنترات.

معالجة التربة خارج الموقع (ex situ). بعد حفر التربة، تنقل عادة الأتربة الملوثة بمواد كيماوية قابلة للتفكيك الحيوي بيسر إلى المفاعلات المهيأة ذات القعر الطويل. ثم يتم انتقاء الكائنات المجهرية المناسبة الموجودة في مزارع تحضيرية من أجل التفكيك الحيوي بفعالية عالية واستخدامها لاحقاً في تلقيح التربة. بعد ذلك تضاف المواد المغذية اللازمة، في حين يمكن تخفيض الملوثات بنسبة تفوق الـ 90٪ خلال أسبوعين، وذلك لدى تأمين التهوئة والمزج الجيد للأكوام التي تكون بارتفاع 2m تقريباً. أما كلفة المعالجة هذه فتتراوح بين € 150-75 m^{-3} من التربة.

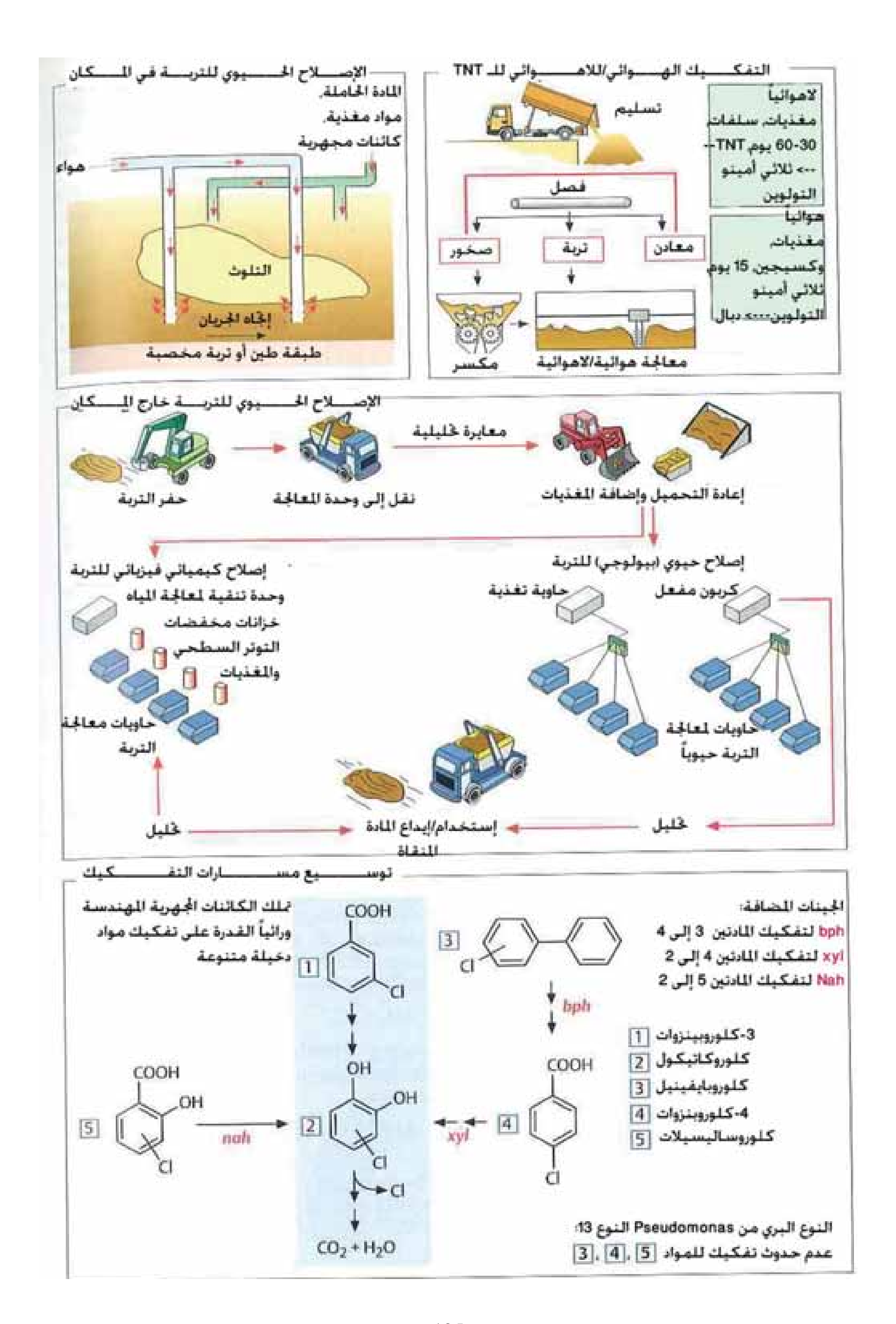
تشكيل الدُبال[7] من ثلاثي النيتروتولوين (Humification of TNT) TNT. إن المواد الدخيلة أو الغريبة عن البيئة مثل الـ TNT وثلاثي أو رباعي الكلوروإيثيلين، التي استبدلت فيها مجموعات كثيرة بأخرى ذات شحنة سالبة، هي صعبة الأيض إلى حد كبير بالشروط الهوائية. غير أنه من جهةٍ أخرى، يمكن أيضها بشكل جيد بواسطة البكتيريا اللاهوائية. لذلك، تم تطوير طريقة لتفكيك الـ TNT في تربة المخيمات العسكرية تعتمد على مزيج من الطريقتين. ففي الخطوة الأولى، يجري ملء المفاعل بـ 25 طناً من التربة الملوثة بالـ TNT لتُحفظ بعد إضافة الساكاروز كمانح للإلكترونات في ظروف لاهوائية. ثم بعد 18 يوماً، يكون قد تّم إلى حد ما اختزال الـ TNT إلى ثلاثي أمينو التولوين ليجري ربطه، خلال الخطوة الهوائية، تشاركياً وبشكل غير عكوس (irreversibly) مع بعض مكونات التربة مثل أحماض الهيوميك (humic acids).

الكائنات المجهرية المأشوبة (Recombinant microorganisms). يمكن بطرائق الهندسة الوراثية دمج خطوات أيضية من كائنات مجهرية مختلفة والحصول على كائنات مجهرية مأشوبة أكثر ملاءمة من سلالات النوع البري في تفكيك المواد الكيميائية المستعصية. لقد تم استكشاف هذه الطريقة مع تحقيق نجاح جدير بالاعتبار في تفكيك المركبات الكلورية العطرية والمفتوحة مثل أحماض الكلوروبنزوين، والكلوروبنزوفوران، ومركبات الهيدروكربون المكلورة (CHC) المفتوحة. في هذه التقانة، غالباً ما يجري استخدام سلالات الـ Pseudomonas لأنها تساهم إلى حد كبير في تفكيك مركبات الهيدروكربون العطرية والمفتوحة حيوياً في البيئة. فهي تحمل في أغلب الأحيان جزءاً من المعلومات الوراثية لهذه الخطوات بشكل بلازميدات؛ مثل بلازميد الـ TOL المفكك للتولوين الذي عُثر عليه أولاً في بكتيريا الـ *Pseudomonas putida*. لقد تمت دراسة مخاطر ومحاسن تحرير الكائنات الحية المعدلة وراثياً (GME) في البيئة بشكل متكرر، لكن إمكانية تطبيق هذه التقانة ما زال موضع نقاش.

---

(6) تربة خصبة مؤلفة من طين ورمل ومواد عضوية.

(7) مادة سمراء أو سوداء تنشأ من تحلل المواد النباتية والحيوانية وتشكل الجزء العضوي من التربة.



الإصلاح الحيوي للتربة في المكان
المادة الحاملة،
مواد مغذية،
كائنات مجهرية
هواء
التلوث
اتجاه الجريان
طبقة طين أو تربة محصبة
التفكيك الهوائي/اللاهوائي للـ TNT
تسليم
لاهوائياً
مغذيات، سلفات
TNT 30-60 يوم
--> ثلاثي أمينو
التولوين
فصل
هوائياً
مغذيات،
وكسيجين 15 يوم
ثلاثي أمينو
التولوين---> دبال
صخور
تربة
معادن
مكسر
معالجة هوائية/لاهوائية
الإصلاح الحيوي للتربة خارج المكان
معايرة تحليلية
حفر التربة
نقل إلى وحدة المعالجة
إعادة التحميل وإضافة المغذيات
إصلاح حيوي (بيولوجي) للتربة
إصلاح كيميائي فيزيائي للتربة
وحدة تنقية لمعالجة المياه
خزانات مخفضات
التوتر السطحي
والمغذيات
حاوية تغذية
كربون مفعل
حاويات معالجة
التربة
حاويات لمعالجة
التربة حيوياً
تحليل
إستخدام/إيداع المادة
المنقاة
تحليل
توسيع مسارات التفكيك
تملك الكائنات المجهرية المهندسة
وراثياً القدرة على تفكيك مواد
دخيلة متنوعة
الجينات المضافة:
bph لتفكيك المادتين 3 إلى 4
xyl لتفكيك المادتين 4 إلى 2
Nah لتفكيك المادتين 5 إلى 2
1 3-كلوروبنزوات
2 كلوروكاتيكول
3 كلوروبايفينيل
4 4-كلوروبنزوات
5 كلوروساليسيلات
COOH
Cl
OH
bph
xyl
nah
$CO_2 + H_2O$
النوع البري من Pseudomonas النوع 13:
عدم حدوث تفكيك للمواد 5، 4، 3

• التنقية الميكروبية، والأغشية الحيوية والتآكل الحيوي
(Microbial leaching, biofilms, and biocorrosion)

عموميات (General). تتم تنقية المعادن من الخامات المنخفضة المحتوى عبر تلقيحها ببكتيريا الـ Thiobacilli بشكل أساسي في الولايات المتحدة الأمريكية والمكسيك وأستراليا: إذ يُنتَج حوالى 25٪ من الإنتاج الاجمالي من النحاس (copper) و10٪ من اليورانيوم و3٪ من الكوبالت والنيكل بالتنقية الحيوية.

علم الأحياء المجهرية وعلم الوظائف (Microbiology and physiology). تتم تنقية المعادن بواسطة بكتيريا الـ Thiobacillus، التي هي عُصَيّات سالبة الغرام تنتمي إلى الكائنات الحية الكيميائية التغذية إجبارياً التي يمكنها استيعاب غاز ثاني أوكسيد الكربون (CO_2). تولد هذه البكتيريا الطاقة عن طريق أكسدة مركبات الكبريت المختَزَلة، مثل أكسدة السلفيدات إلى حمض الكبريت (sulfuric acid). وإلى جانب الـ *T. thiooxydans*، هناك أيضاً الـ *T. ferrooxydans* القادرة على أكسدة ليس فقط مركبات الكبريت المختزلة، ولكن أيضاً أملاح الحديد (Fe^{+2}) المنحلة. فمن أجل تصنيع 1g وزن جاف من الخلايا، تقوم الـ *T. ferrooxydans* بأكسدة 156g Fe^{+2} بالمقابل. إن كلتا هاتين البكتيريا مكيفتان جيداً للنمو في شروط حمضية حتى تحت قيمة 2 من الرقم الهيدروجيني (pH). كما يمكن لبكتيريا الـ Thiobacilli حل الخامات (ores) المعدنية السلفيدية والأوكسيدية مثل: البيريت (pyrite)[8] (FeS_2)، والكالشوسيت (calchocite) (CuS_2)، والكوفيليت (CuS) (covellite)، والسفاليريت ـ التوتياء ـ (ZnS)، وسلفيدات الرصاص والموليبدم والأنتيموني (PbS، MoS_2، Sb_2S_3)، وسلفيدات الكوبالت والنيكل (CoS، NiS)، وكذلك أوكسيدات مثل أوكسيد اليورانيوم[9] (Pitchblende) (UO_2). وأثناء عملية التنقية البكتيرية المباشرة، تؤكسِد الـ Thiobacillus المعادن مباشرة مروراً، بعدة خطوات وسيطة، وفق المعادلة:

سلفيد معدني + 2 O_2 ← سلفات معدني

(metal sulfide + $2O_2 \rightarrow$ metal sulfate)

وعلى العكس، يكون فعل الـ Thiobacillus في عملية التنقية البكتيرية غير المباشرة محفِّزاً، حيث تساعد عملية الأكسدة الكيميائية الأرضية ـ الجيوكيميائية ـ لسلفيدات المعادن لتعطي معدناً ثنائي الشحنة الإيجابية (Me^{2+})، وكذلك أكسدة السلفيدات وفق المعادلة:

سلفيد معدني + $Fe_2(SO_4)_3$ ← سلفات معدن + $2FeSO_4 + S^0$

(metal sulfide + $Fe_2(SO_4)_3 \rightarrow$ metal sulfate + $2FeSO_4 + S^0$)

وذلك عند درجة pH شديدة الحموضة. تفوق الأكسدة البكتيرية للحديد (Fe^{+2}) بحوالى 10^5-10^6 مرة الأكسدة الكيميائية وذلك عند pH 2-3. وبسبب التركيبات المعقدة للخامات المعدنية، يمكن استخدام كلا النمطين من التنقية في التطبيقات على أرض الواقع.

التقانة (Technology). من أجل الوصول إلى فعالية عالية، فإنه يجب تحقيق أو أَمثَلة المعايير التالية: التركيب الكيميائي وحجم تشبيك المعدن، المغذي المعدني، الرقم الهيدروجيني (pH) المنخفض جداً، إمكانية الخزلدة الإيجابية، درجة الحرارة عند 30ºC، والتزويد الجيد بالأكسيجين. يمكن تنفيذ العملية في الموقع (*in situ*) ضمن المناجم، أو في أكوام الخامات أو في خزانات. وكبديل، يمكن غمر أنفاق المناجم المهجورة لتنقية الخامات في الموقع. إن التقانة الأكثر تقدماً هي تلك المستخدمة في التنقية على مستوى الخزانات، بحيث أكثر ما تكون منافسةً لعمليات التعدين الحراري إذا سيطرت تراكيز معدنية عالية التبعثر من الفلز، وإذا تم أخذ المظاهر البيئية في الحسبان.

الأغشية الحيوية والتآكل الحيوي (Biofilms and biocorrosion). تتشكل الأغشية الحيوية عندما تلتصق البكتيريا على السطوح في البيئات المائية وتبدأ بافراز البوليميرات الحيوية التي تثبتها على مواد مثل المعادن أو الأنسجة. يتكون الفيلم الحيوي عادة من عدة أنواع من البكتيريا وكذلك الفطور، والطحالب، والأوليات، والحطام ومنتجات التآكل. في عمليات التآكل الميكروبي للحديد المعدني، يخضع الحديد (Fe^0) «لأكسدة لاهوائية» فيتحول إلى FeS، وذلك بتحفيز مختزلات السلفات اللاهوائية (anaerobic sulfate reducers) مثل *Disulfovibrio vulgaris* وفقاً للمعادلة:

$$4\,Fe + SO_4^{2-} + 2\,H_2O \rightarrow FeS + 3\,Fe(OH)_2$$

ويتأكسد الحديد بشروط لاهوائية وفقاً للمعادلة:

$$4\,Fe + 8\,H^+ \rightarrow 4\,Fe^{2+} + 4\,H_2$$

كما تحمي طبقة الهيدروجين المنتجة خلال هذه العملية المعدن من الأكسدة الإضافية. إلا أنه بوجود السلفات، تقوم *Disulfovibrio* باختزال السلفات وفقاً للمعادلة:

$$4\,H_2 + SO_4^{2-} \rightarrow H_2S + 2\,H_2O + 2\,OH^-$$

مؤدية إلى مزيد من تآكل الحديد (Fe^O) من خلال ترسيب سلفات الحديد وهيدروكسيد الحديد:

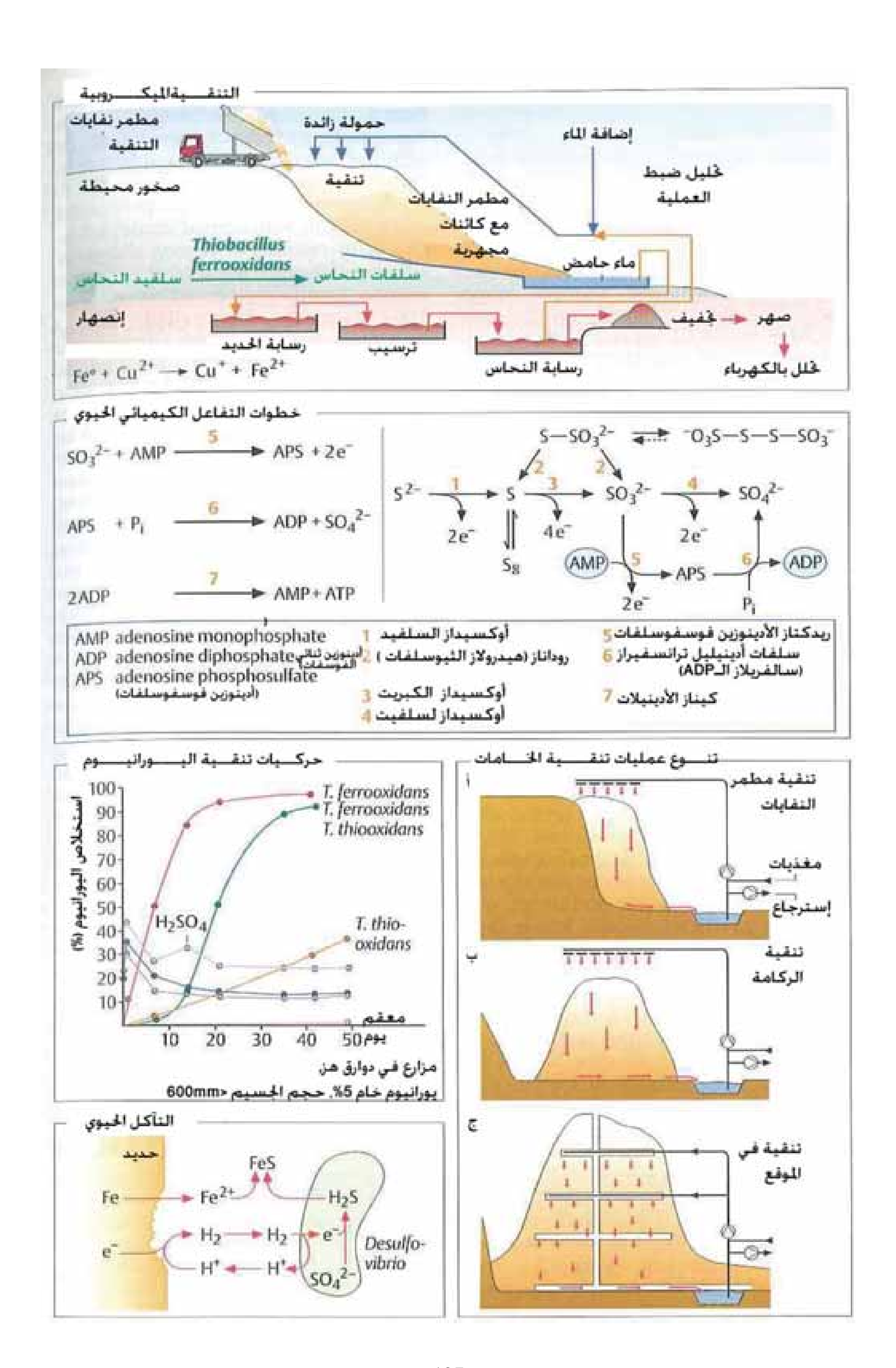
$$4\,Fe^{2+} + H_2S + 2OH^- + 4H_2O \rightarrow FeS + 3Fe(OH)_2 + 6H^+$$

حيث تصل أضرار أنابيب الحديد الناجمة عن هذه العملية الميكروبية إلى مليارات اليورو.

---

(8) البيريت: معدن أصفر مكون من كبريت وحديد

(9) أكسيد اليورانيوم: معدن أسود لامع يُنتج الراديوم.



التنقـــيةالميكــــروبية
مطمر نفايات التنقية
حمولة زائدة
إضافة الماء
تنقية
صخور محبطة
تحليل ضبط العملية
مطمر النفايات مع كائنات مجهرية
Thiobacillus ferrooxidans
سلفيد النحاس
سلفات النحاس
ماء حامض
إنصهار
رسابة الحديد
ترسيب
رسابة النحاس
تجفيف
صهر
تحلل بالكهرباء
$Fe^{0} + Cu^{2+} \rightarrow Cu^{+} + Fe^{2+}$
خطوات التفاعل الكيميائي الحيوي
$SO_3^{2-} + AMP \xrightarrow{5} APS + 2e^-$
$APS + P_i \xrightarrow{6} ADP + SO_4^{2-}$
$2ADP \xrightarrow{7} AMP + ATP$
$S-SO_3^{2-} \rightleftharpoons {}^-O_3S-S-S-SO_3^-$
$S^{2-} \xrightarrow{1} S \xrightarrow{3} SO_3^{2-} \xrightarrow{4} SO_4^{2-}$
$2e^-$ $4e^-$ $2e^-$ S_8 AMP APS ADP $2e^-$ P_i
AMP adenosine monophosphate
ADP adenosine diphosphate (أدينوزين ثنائي الفوسفات)
APS adenosine phosphosulfate (أدينوزين فوسفوسلفات)
1 أوكسيداز السلفيد
2 روداناز (هيدرولاز الثيوسلفات)
3 أوكسيداز الكبريت
4 أوكسيداز لسلفيت
5 ريدكتاز الأدينوزين فوسفوسلفات
6 سلفات أدينيليل ترانسفيراز (سالفريلاز الـADP)
7 كيناز الأدينيلات
حركـيات تنقية اليـورانيـوم
استخلاص اليورانيوم (%)
T. ferrooxidans
T. ferrooxidans T. thiooxidans
T. thio-oxidans
H_2SO_4
معقم
يوم
مزارع في دوارق هز
يورانيوم خام 5%، حجم الجسيم <600mm
التأكل الحيوي
حديد
Fe
e^-
Fe^{2+}
FeS
H_2S
H_2
H^+
SO_4^{2-}
Desulfovibrio
تنـوع عمليات تنقـيـة الخـامات
أ تنقية مطمر النفايات
مغذيات
إسترجاع
ب تنقية الركامة
ج تنقية في الموقع

■ التقانة الحيوية الطبية

• الإنسولين (Insuline)

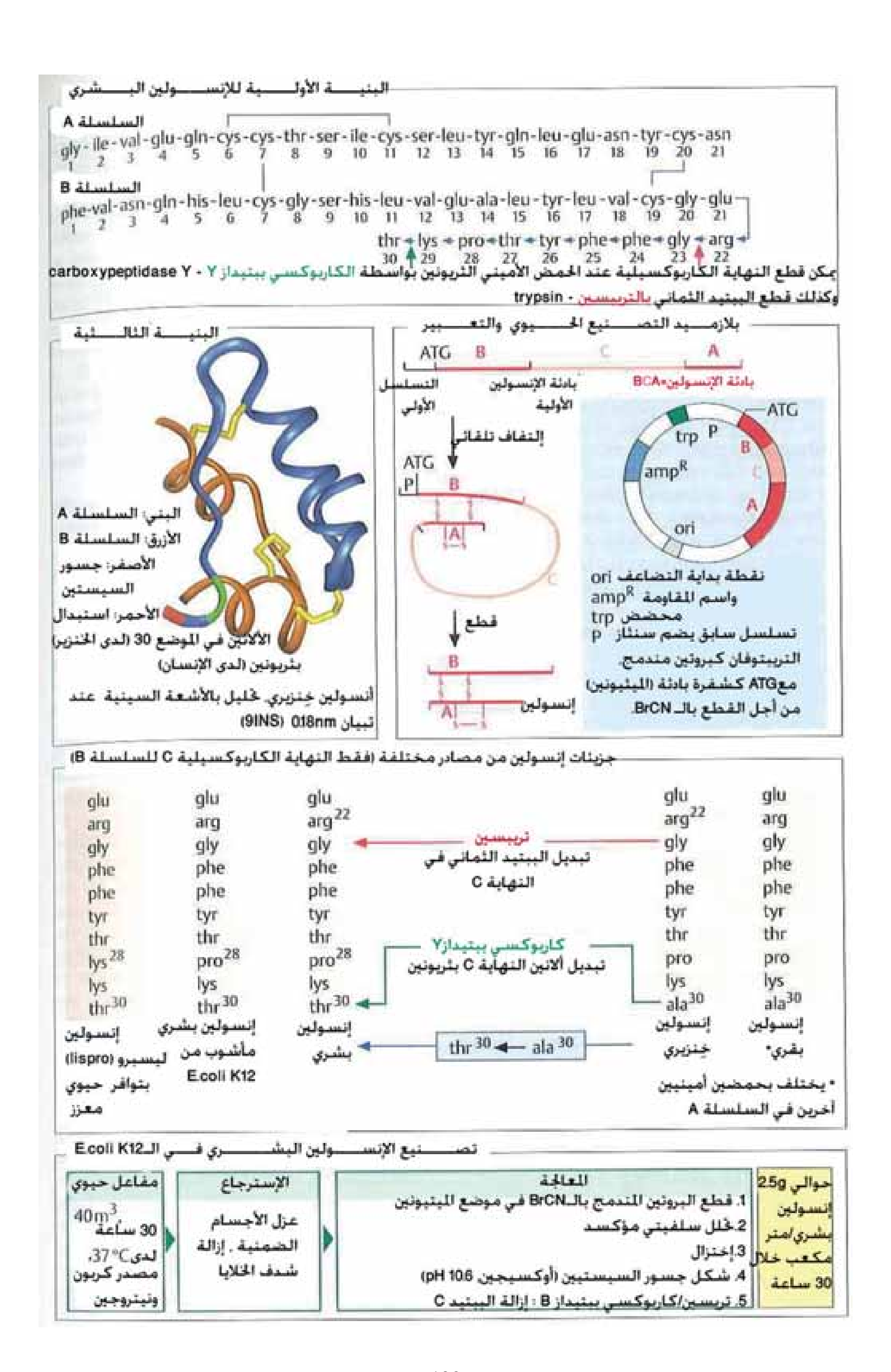
عموميات (General). الإنسولين هو هرمون عديد الببتيد (polypeptide) ينظم مستوى الغلوكوز (glucose) في دم الفقاريات (invertibrates). كما أنه دواء مفتاحي في علاج داء السكري (diabetes mellitus) أو فرط السكر بالدم. حتى عام 1985، كان الإنسولين يحضَّر بالاستخلاص من غدد بنكرياس الحيوانات المذبوحة. وبعد ذلك، أصبح إنتاج الإنسولين البشري المأشوب (recombinant) في الـ *Echerichia coli* والـ Succharomyces cerevisiea تقانة الإنتاج المسيطرة. يبلغ حجم السوق الإجمالي حوالى 8 طن سنوياً، مع قيمة 1 بليون دولار أمريكي في السنة تقريباً.

داء السكري (Diabetes mellitus). يتصف داء السكري بعجز في تصنيع وتحرير الإنسولين. في الحالة الأكثر شيوعاً المعروفة بالنوع الثاني لداء السكري (داء سكري البالغين)، يمكن في أغلب الأحيان تنشيط إنتاج الإنسولين من البنكرياس بالأدوية. بينما في النوع الأول فلا يتشكل الإنسولين من الأساس، إما بسبب عيب وراثي أو إصابة فيروسية أو مرض مناعة ذاتية (autoimmune dIsease). ونتيجة لذلك، يجب في هذا النوع ضبط مستوى الغلوكوز في الدم بالتزود الثابت بالإنسولين من خلال الحقن عبر الجلد (transcutaneouse) أو داخل العضل (intramuscular). هناك حوالى 140 مليون شخص يعانون داء السكري في العالم، 60 مليوناً منهم مرضى بالنوع الأول (800000 مريض تقريباً في ألمانيا). كما أن أكثر من 2٪ من سكان الدول الصناعية مرضى بالنوع الثاني (2.4 مليون مريض تقريباً في ألمانيا).

التصنيع الحيوي (Biosynthesis). يُصنَّع الإنسولين في خلايا بيتا من البنكرياس على شكل بادئات إنسولين أولية (preproinsuline)، بعد ذلك، تجري معالجتها لإعطاء بادئات الإنسولين التي يجري تخزينها في جهاز غولغي (golgi). وعند تحريضها بآلية معقدة تتضمن ارتفاع سكر الدم (hypoglycemia)، فإنه يتم تحليل (hydrolyzed) هذه البادئات بواسطة أنزيمات البروتياز المرتبطة بالغشاء (membrane-bound proteases) إلى ثلاث سلاسل عديدة الببتيد (A، B وC)، بحيث يتم دمج السلسلتين A وB (المكونتين من 21 و30 حمضاً أمينياً على التوالي) بواسطة ثلاثة جسور سيستين (cystine bridges) لتشكل الإنسولين الفعال، في حين تُحرَّر السلسلة C (31 حمض أميني) ليتم هدمها (catabolized).

الإنتاج (Production). لقد تم إدخال العلاج بالإنسولين حيز التنفيذ عام 1928. تجري عملية إنتاج هذا الهرمون تقليدياً باستخلاص بنكرياس البقر أو الخنازير بمحلول 1 ـ بوتانول (1-butanol) أولاً، ثم ترسيبه بشكل ملح الزنك الذي يمكن بلورته بسهولة، وبعد ذلك تنقيته بشكلٍ إضافي بواسطة كروماتوغرافيا الهلام وإعطاء قمة منفردة تشير إلى الإنسولين النقي («Single-peak insulin»). تغطي كمية الإنسولين الممكن تحضيرها من بنكرياس الخنزير الواحد حاجة مريض داء سكري لثلاثة أيام، وتلك المحضرة من بنكرياس البقرة لعشرة أيام ما يمثل عنق الزجاجة (عائقاً هاماً) في الإنتاج الصناعي. إضافة إلى ذلك، يختلف الإنسولين البشري والخِنزيري والبقري بحمض أو حمضين أمينيين، ما يبرر التفاعلات الأرجية (التحسسية) العكسية التي نتجت عرضياً لدى مرضى داء السكري من جراء التداوي المستمر بالإنسولين الحيواني. من جهةٍ أخرى، وعلى الرغم من أن التصنيع الكيميائي للإنسولين البشري قد نجح منذ عام 1964، إلا أنه ثبت عدم إمكانية اعتماده اقتصادياً. في عام 1975 تم إيجاد حل مؤقت لمشكلة الأرجية الناشئة عن الاستخدام المستمر للإنسولين الحيواني، من قبل شركة نوفونورديسك الدانماركية عندما تم تحويل الإنسولين الخِنزيري إلى إنسولين بشري بتحفيز أنزيمي باستخدام أنزيم الكاربوكسي بيبتيداز (carboxypeptidase Y)، الذي يغير النهاية الكاربوكسيلية (C-terminal) في الموضع رقم 30 من الألانين (Ala^{30}) إلى الثريونين (Thr^{30}). إلا أنه منذ عام 1985 أصبح إنتاج الإنسولين البشري المأشوب بواسطة التخمير الطريقة المختارة. فقد تم تحضير الـ DNA المشفر لبادئة الإنسولين الأولية بالتصنيع الكيميائي، ما سمح بأمثلة استخدام الشيفرة بما يلائم الكائن الحي المضيف وهو الـ *E.coli K12*. كما كان قد تم بإجراءات سابقة، ولأسباب تتعلق بالأمان، التعبير عن السلسلتين A وB وتنقيتهما بشكل منفصل، ثم تحويلهما كيميائياً إلى جزيء إنسولين فعال بخطوة أكسدة. أما اليوم، فيتم إنتاج بادئة الإنسولين المأشوبة كبروتين مندمج مع التربتوفان سينثاز (tryptophan synthase) لتتم معالجتها بعدة خطوات والحصول إلى الإنسولين الفعّال. تصنِّع سلالات الإنتاج المحسَّنة من الـ *E.coli* حتى 40٪ من كتلة خلاياها بادئة الإنسولين كبروتين مندمج. وعليه، فإن مفاعل حيوي بحجم $40m^3$ يقدم تقريباً 100g من الإنسولين البشري المأشوب النقي (ما يوازي 1٪ من الطلب العالمي السنوي). كما اقترحت طريقة مختلفة تبدأ بالتعبير عن بادئة إنسولين مصغرة باستخدام سلالات مأشوبة من خميرة الخبز.

أشكال جديدة من الإنسولين (New types of insulin). إن الإنسولين البشري الذي عُدِّل فيه تسلسل الحمض الأميني من لايزين 28 (lys^{28}) إلى برولين 29 (pro^{29})، من خلال الهندسة البروتينية، يتصف بتوافر حيوي أسرع بعد الحقن مسهلاً برمجة تناول الطعام. ومن بين أنواع أخرى يذكر: $pro^{28}asp$ (إنسولين أسبارت (Insulin Aspart) سريع التأثير، ومسجل)، $asn^{3}lys$ $lys^{29}glu$ (إنسولين غلوليزين، سريع التأثير، قيد الاختبار في الطور الثالث)، $thr^{30}arg^{31}arg$ (في السلسلة B) $asn^{21}gly$ (في السلسلة A) (إنسولين غلارجين ذي الفعالية المديدة)، وإنسولين أضيف له الأسيل (acylated) على lys^{39} (NN304).



البنيــــة الأولــــية للإنســـــولين البـــــشري
السلسلة A
gly-ile-val-glu-gln-cys-cys-thr-ser-ile-cys-ser-leu-tyr-gln-leu-glu-asn-tyr-cys-asn
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
السلسلة B
phe-val-asn-gln-his-leu-cys-gly-ser-his-leu-val-glu-ala-leu-tyr-leu-val-cys-gly-glu
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
thr-lys-pro-thr-tyr-phe-phe-gly-arg
30 29 28 27 26 25 24 23 22
يمكن قطع النهاية الكاربوكسيلية عند الحمض الأميني الثريونين بواسطة الكاربوكسي ببتيداز Y - carboxypeptidase Y
وكذلك قطع الببتيد الثماني بالتريبسين - trypsin
البنيـــة الثالــــثية
البني: السلسلة A
الأزرق: السلسلة B
الأصفر: جسور السيستين
الأحمر: استبدال الألانين في الموضع 30 (لدى الخنزير) بثريونين (لدى الإنسان)
أنسولين خنزيري تحليل بالأشعة السينية عند تبيان 0.18nm (9INS)
بلازمــيد التصـــنيع الحـــيوي والتعـــبير
ATG
B
C
A
التسلسل الأولي
بادئة الإنسولين الأولية
بادئة الإنسولين BCA=
الالتفاف تلقائي
ATG
P
B
A
C
قطع
B
A
إنسولين
ATG
trp
P
B
C
A
amp^R
ori
ori نقطة بداية التضاعف
amp^R واسم المقاومة
trp محضض
P تسلسل سابق يضم سنتاز التريبتوفان كبروتين مندمج
مع ATG كشفرة بادئة (الميثيونين) من أجل القطع بالـ BrCN
جزيئات إنسولين من مصادر مختلفة (فقط النهاية الكاربوكسيلية C للسلسلة B)
glu arg gly phe phe tyr thr lys28 lys thr30
إنسولين ليسبرو (lispro) بتوافر حيوي معزز
glu arg gly phe phe tyr thr pro28 lys thr30
إنسولين بشري مأشوب من E.coli K12
glu arg22 gly phe phe tyr thr pro28 lys thr30
إنسولين بشري
تريبسين
تبديل الببتيد الثماني في النهاية C
كاربوكسي ببتيدازY
تبديل الألنين النهاية C بثريونين
thr 30 ← ala 30
glu arg22 gly phe phe tyr thr pro lys ala30
إنسولين خنزيري
glu arg gly phe phe tyr thr pro lys ala30
إنسولين بقري*
* يختلف بحمضين أمينيين آخرين في السلسلة A
تصــــنيع الإنســـولين البشـــــري فـــي الـ E.coli K12
مفاعل حيوي
40m3
30 ساعة
لدى 37°C،
مصدر كربون ونيتروجين
الإسترجاع
عزل الأجسام الضمنية . إزالة شدف الخلايا
المعالجة
1. قطع البروتين المندمج بالـBrCN في موضع الميثيونين
2. تحلل سلفيتي مؤكسد
3. إختزال
4. شكل جسور السيستين (أوكسيجين pH 10.6)
5. تريبسين/كاربوكسي ببتيداز B : إزالة الببتيد C
حوالي 2.5g إنسولين بشري/متر مكعب خلال 30 ساعة

هرمون النمو وهرمونات أخرى

(Growth hormone and other hormones)

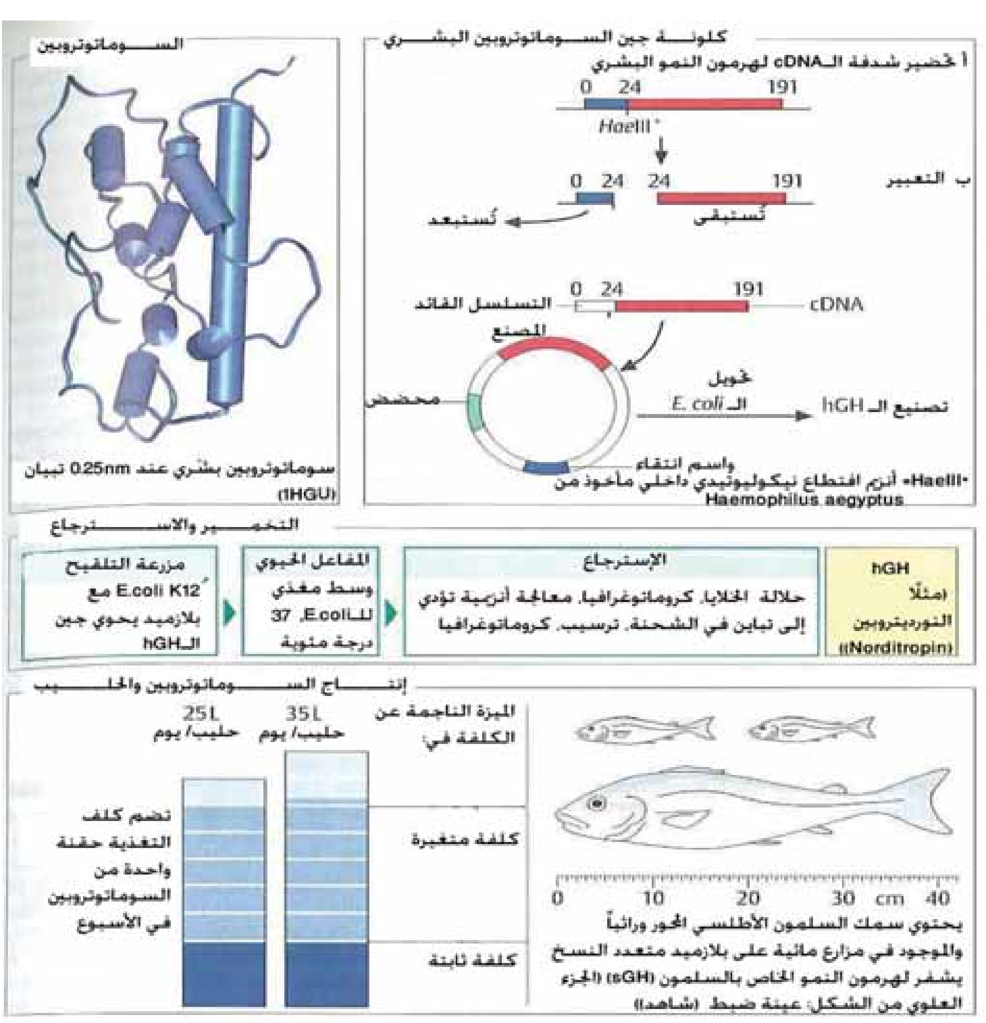
عـمـومـيـات (General). إن هـرمـون الـنـمـو (growth hormone (GH)) أو السوماتوتروبين (Somatotropin)) هو أهم هرمون، بعد الإنسولين، تم إنتاجه بتقانات الهندسة الوراثية. وهو يُصنع في الفص الأمامي من الغدة النخامية (anterior pituitary gland) ويقوم بتنظيم مدى واسع من الوظائف الأيضية (metabolic functions). هناك آليتان ذات أهمية خاصة في تأثير هذا الهرمون: إذا كان وارد الغذاء مرتفعاً، يقوم هرمون النمو بتثبيط تصنيع الشحوم، وبالتالي يوجه استخدام الطاقة لتصنيع البروتينات حيوياً، مثلاً، في الغدد الثديية ونسيج العضلات. فيكون لهرمون النمو تأثير بنائي (anabolic effect) يقود إلى تعزيز البروتين في الجسم، وانقاص تشكل الدسم، وزيادة إنتاج الحليب عند الحيوانات الحلوبة. أما التأثير الثاني فهو في فعاليته التحفيزية للنمو والموسَّطة من خلال عامل النمو 1 الشبيه بالإنسولين (Insulin-like growth hormone (IGF-1)) الذي يتشكل في الكبد ويحرّض انقسام الخلايا في معظم الأنسجة.

هرمون النمو البشري (Human growth hormone hGH) عبارة عن عديد ببتيد مؤلَّف من 191 حمضاً أمينياً حاملاً لجسرين من ثنائيي السلفيد (disulfide bridge). إن استعماله علاجياً سوى عن طريق الفم (parenteral) منتشر بشكل واسع عند الأطفال المصابين بتأخر النمو، وذلك بعد تفسير تأخر نمو الطول بعدم كفاية الإفراز الداخلي المنشأ (endogenous) من هذا الهرمون (بتردد 0.1٪). لذلك، يكون إعطاء هرمون نمو خارجي المنشأ (exogenous) غير فعّال في حالات تأخر النمو العائد لعيوب في مستقبِل هرمون النمو. إلا أنه في المقابل، يمكن أن يقود الإنتاج الزائد منه إلى فرط نمو الأطفال وإلى مرض تضخم الأطراف (acromegaly) عند البالغين (حالة نمو مفرط في الأذنين والأنف وأصابع اليدين والقدمين).

السوماتوتروبين (somtotropin) الحيواني. يختلف هرمون النمو البقري (bovin growthhormone (bGH)) عن الهرمون النمو البشري (human GH (hGH)) بـ 67 حمضاً أمينياً، وهو ينتج أيضاً بتقانات الهندسة الوراثية. تم تسجيله منذ عام 1990 في الولايات المتحدة الأمريكية (ولكن ليس في دول الاتحاد الأوروبي واليابان) لزيادة إنتاج الحليب في البقر؛ حيث يعود تأثيره هذا إلى تعزيز تزويد الضرع بالطاقة. عند الخنازير، يستخدم هرمون النمو الخِنزيري (porcine growth hormone (pGH)) لتحسين عملية التسمين بزيادة البروتين وإنقاص تصنيع الشحوم. فهو يستخدم بشكل رئيسي لتسمين نسيلة الخنازير التي تنتج كميات كبيرة من الشحوم على حساب البروتين. وبالرغم من كون هرمون النمو البشري فعالاً في الثدييات الأقل تطوراً، فإن كلا الهرمونين البقري والخنزيري لا يُظهران تأثيرات بنائية (anaboli effects) عند الإنسان. لذا، فإن مخاطر بقايا الفعالية الهرمونية في السلسلة الغذائية من استهلاك الحليب أو لحم الخنزير المعالج بهرمون النمو معدومة، خاصة أنه يتم تناول هذه البروتينات عن طريق الجهاز الهضمي حيث يتم تفكيك البروتينات. وحتى لو أعطي عن طريق غير الفم (parenterally)، فإن هرمون النمو لا يخزن في الأنسجة. لقد تمت في مزارع مائية تربية سمك السلمون المحور وراثياً (transgenic salmon) بكلونة (cloning) هرمون نمو السلمون خلف محث (promoter) نشط جداً خاص ببروتين مانع التجمد (antifreeze protein). فكان نمو هذه الأسماك أكبر بـ 3 ـ 10 مرات من نمو الأسماك غير المعالجة. ويعتقد أن الإنتاج التجاري لهذه الأسماك لا يحمل أي خطر بيئي كون الزرعات المائية مغلقة، بالإضافة إلى أن التلاعب (manipulation) بـ DNA الكروموزومات يؤدي إلى العقم.

عمليات التخمير والاسترجاع (Fermentation and recovery). كان يتم الحصول على هرمون النمو قبل ظهور تقنيات الهندسة الوراثية بالاستخلاص من الغدد النخامية بكميات محدودة ونوعية ركيكة. ومنذ عام 1984، أصبح ينتج هذا الهرمون من خلال الهندسة الوراثية بواسطة سلالات مأشوبة من الـ *E.coli* في الغالب. لقد كانت كلونة هرمون النمو البشري صعبةً في البداية، حيث إن الهرمون والـ RNA الرسول (mRNA) الخاص به ينتجان بكميات ضئيلة في الغدد النخامية، كما أن تجارب الكلونة يجب أن تتم في موقع واحد على الـ DNA المتمم (cDNA) للهرمون. لقد أزيلت هذه العقبة بالتصنيع الكامل للقسم 5′ من الـ DNA المتمم، ودمجه مع الشدفة 3′ بإطار القراءة المفتوح (open reading frame (ORF)) الذي يمكن التعبير عنه في الـ *E.coli.* حالياً، يتم في العمليات الصناعية تصنيع هرمون النمو البشري الطبيعي لتجاوز أي مخاطر مناعية المنشأ أثناء التداول المستمر. في حين تتم تنقية الهرمون المأشوب عبر سلسلة من خطوات الكروماتوغرافيا (chromatography).

هـرمـونـات مـأشـوبـة أخـرى (Other recombinant hormones). لقد تمت كلونة العديد من الهرمونات الأخرى، التي تتم حالياً دراستها بواسطة فحوص متباينة التقدم بغرض تسجيلها. وهناك بعض العلاجات الجديدة الواعدة، كاستخدام هرمون الغدة المجاورة الدُريقة (parathyroid hormone) المأشوب في علاج هشاشة العظام (osteoporosis). إلا أن هرمونات التكاثر الحيواني مثل الغونادوتروبين (gonadotropins) (الهرمون المنبه للجريب (follicule-stimulating hormone (FSH)) والهرمون الُلوتِن (luteining hormone (LH)) تم استبدالها لأسباب اقتصادية أكثر بالمضاهئات (analogs) الطبيعية (مثل غونادوتروبين مصل الفرس الحامل (PMSG)).



هرمونات مأشوبة أخرى (انتقاء)

	التطبيق	الشركة	الوضع الحالي
غلوكاغون (Glucagon)	انخفاض سكر الدم	Novo Nordis	مسجل
الهرمون المنشط للجريب-follicle) stimulating hormone (FSH))	العقم	Serono، Organon وآخرين	قيد التسجيل
إنهيبين (Inhibin)	مانع حمل	Biotech أستراليا	
كالسيتونين (Calcitonin)	أمراض العضلات الهيكلية	Suntory، Chugai وآخرين	
الهرمونات المجاورة للدَّرقية (parathyroid hormone (PTH))	ترقق العظام	Allelix	في الطور الثاني من الاختبارات السريرية
ليبتين (Leptin)	كبح الشهية	Amgen	في الطور الثاني من الاختبارات السريرية
الهرمون المنشط للغدة الدرقية	سرطان الغدة الدرقية	Genzyme	
ببتيد مدر للصوديوم (Atrial natriuretic peptide)	الفشل الكلوي	Scios /Genentech	في الطور الثالث من الاختبارات السريرية

• الهيموغلوبين، ألبومين المصل واللاكتوفيرين

(Hemoglobin, serum albumen, and lactoferin)

عموميات (General). يتكون الدم من خلايا معلقة في المصل (بلازما الدم (Blood plasma)). وهو عند الكائنات الحية متعددة الخلايا (multicellular organisms)، الوسط الأكثر أهمية لنقل المستقلبات (metabolites)، ودرء (buffering) الرقم الهيدروجيني (pH)، وتنظيم درجة حرارة الجسم وتوازن الماء، والدفاع ضد العوامل الممرضة. حوالى 20٪ من جميع جينات الإنسان تُشفِر (code) إلى بروتينات الدم، منها: الهيموغلوبين (hemoglobin) الموجود في كريات الدم الحمراء الذي يقوم بنقل الأكسيجين إلى عشرات ملايين الخلايا المكونة للجسم، والألبومين (albumen) الذي ينقل غالب المركبات القليلة الانحلال بالماء في الدم. كما تضم بروتينات الدم أيضاً: السيتوكينات (cytokines)، وهي هرمونات تضبط العديد من وظائف الخلية بانتقائية عالية مثلما تضبط عوامل النمو نمو أنواع منتقاة من الخلايا، كما أنها تنظم انتشار خلايا الدم التي تساهم في الدفاع ضد العوامل الممرضة وكذلك تشكيل الأجسام المضادة من قبل الخلايا البائية (B-cells)؛ وسلسلة البروتينات المعقدة (complex protein cascade) التي تنظم لزوجة الدم عبر تشكيل مضادات التخثر (anticoagulants) ما يُجنِب تشكل كتل صفيحات الدم (platelets)، وتشكيل الفيبرين عند إصابة وعاء دموي من أجل تخثير الدم ووقف النزيف. لذلك، يمكن أن يؤدي حدوث أي خلل في وظائف هذا التوازن الحساس القائم على عمل بروتينات الدم إلى أمراض عديدة. ومع ظهور الهندسة الوراثية، أصبح ممكناً إنتاج بروتينات ذات دور في هذه العمليات المعقدة بكميات هامة تفيد في كل من البحوث الطبية وفي الاستخدام العلاجي.

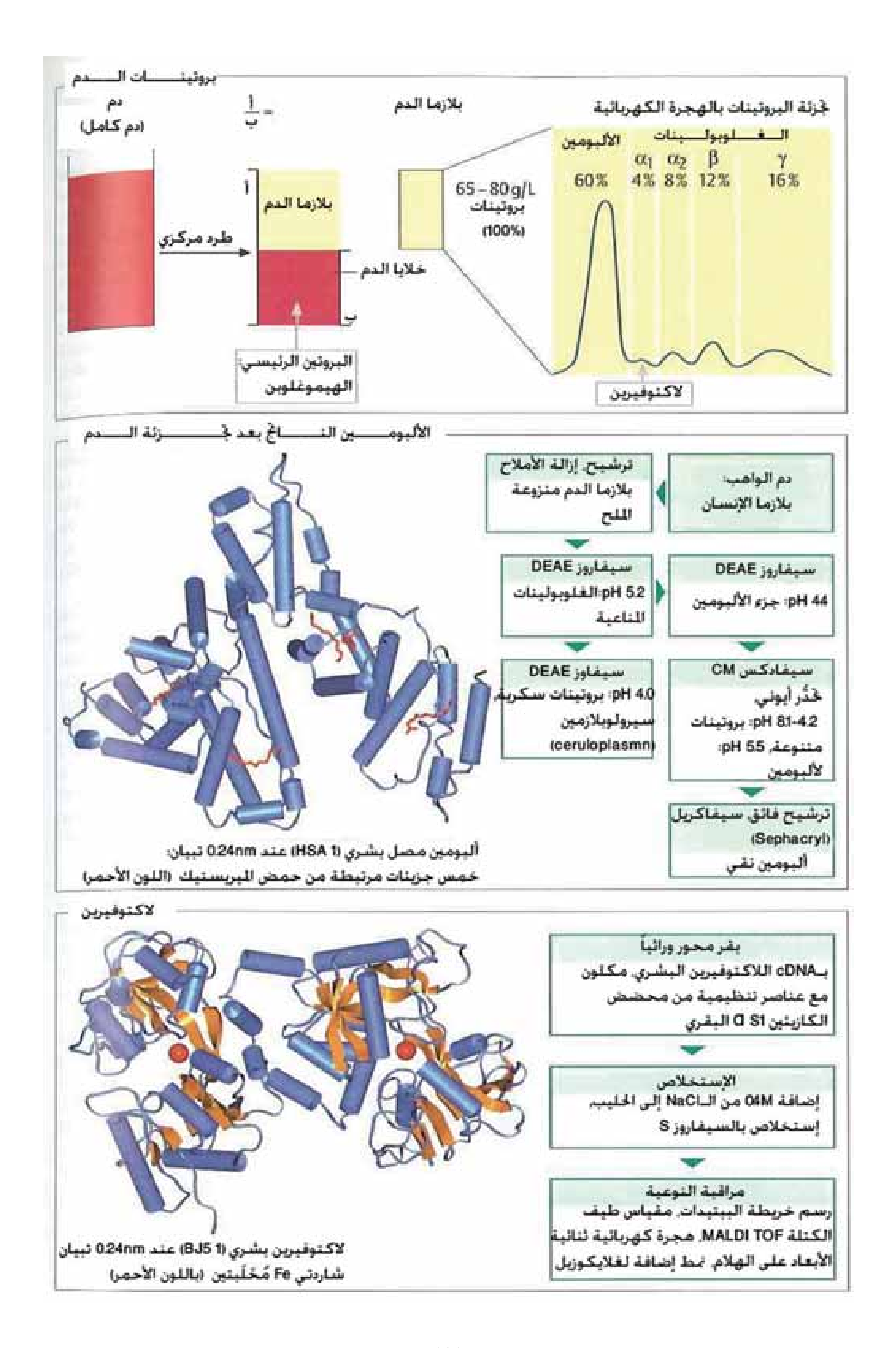
الهيموغلوبين (Hemoglobin) هو البروتين الأساسي في خلية الدم الحمراء؛ عبارة عن جزيء $_{\alpha 2}\beta_2$ رباعي الأقسام (tetramere) لا يحوي الغلايكوزيد (nonglycosylate)، ذي وزن جزيئي بقيمة 64kDa، ومكون من زوج (a وb) وحدات فرعية (subunits) متطابقة تحمل أربع مجموعات هيم (heme groups). ومن خلال آلية تنظيم ألوستيرية[10] (allosteric)، يؤدي ارتباط جزيء أكسيجين واحد بالهيموغلوبين إلى رفع ألفة (affinity) مجموعات الهيم الأخرى للأكسيجن. أما بالنسبة إلى العلاج بالهيموغلوبين فيُطبَّق بعد حالات فقدان كميات كبيرة من الدم خلال نقل دم كامل أو كريات حمراء مركزة مأخوذة من متبرعين ـ حيث إنه علاجٌ لا يخلو من المخاطر لإمكانية حدوث تفاعلات مناعية جانبية، وإمكانية كون دم المتبرع ملوثاً بالفيروسات. نتيجة لذلك، تمت كلونة جين الهيموغلوبين البشري والتعبير عنها في الـ *E.coli*، الـ *S.cerevisiae* أو خنازير محورة وراثياً. وبالرغم من أنه قد تم الحصول على الهيموغلوبين بنقاوة عالية في هذه التقنية، إلا أن هذا البروتين المعزول سام للكلية وغير ثابت خارج خلايا الدم الحمراء: فهو يتفكك بسهولة إلى جزيئات βα الثنائية (dimer) التي بدورها تتفكك بالتحلل البروتيني. لذا يجري حالياً اختبار طرائق هندسة البروتينات والتغليف الدقيق (microencapsulation) للتخلص من هذه المعوقات.

ألبومين المصل (hSA). وهو بروتين لا يحوي الغلايكوزيد (nonglycosylated)، ذي وزن جزيئي يبلغ 69kDa، يتكون في الكبد بشكل بادئات ألبومين أولية (preproalbumen)، ويشكل حوالى 60٪ من كافة بروتينات المصل مما يعطيه تأثيراً كبيراً في الضغط التناضحي (osmotic pressure) في الدم. يرتبط بروتين الألبومين هذا بالمركبات ذات الانحلالية المحدودة في الماء كالدهون ليقوم بنقلها في مجرى الدم. وهو يستخدم طبياً بشكل أساسي كموسع لحجم المصل (plasma expender) في معالجة الصدمة إثر فقدان كميات كبيرة من الدم. لهذا الغرض، يمكن الحصول عليه عن طريق تجزئة الدم (blood fractionation) بسلسلة من خطوات الترسيب والكروماتوغرافيا (chromatography)، حيث تزال الفيروسات والعوامل الممرضة الأخرى بالتسخين المضبوط على حرارة 60ºC لعدة ساعات من أجل الحصول على منتج طبي معقم. لكن الإصابات الشديدة عادةً ما تحدث مراراً وتكراراً إثر عمليات نقل الدم. لذا، جرت محاولات تحضير بروتين الألبومين الفعال وظيفياً بواسطة عمليات التخمير في سلالات من الكائنات المأشوبة المضيفة مثل *Bacillus subtilis*، *E.coli*، و*Saccharomyces cerevisiae*، وكذلك في نباتات محورة وراثياً وحليب مأخوذ من ماعز محور؛ التي تكللت بالنجاح. إلا أنه لم يتم بعد تسجيل ألبومين المصل البشري المأشوب هذا للعلاج البشري.

اللاكتوفيرين (Lactoferrin) (ذو وزن جزيئي يبلغ 77kDa) عبارة عن بروتين ذي وظائف مضادة للبكتيريا وللالتهاب. تعود فعاليته على الأرجح للألفة العالية التي يمتلكها لدى ارتباطه بال Fe^{+3}. يوجد هذا البروتين في حليب الحيوانات الحلوبة، التي تحتوي على حوالى $100mgL^{-1}$ لاكتوفيرين. كما تم في سلسلة من التجارب كلونته خلف المحث كازيئين ـα_{s1}، (α_{S1}-casein) البقري، حيث تم بنجاح إنتاج حتى $30gL^{-1}$ لاكتوفيرين في قطيع من الأبقار المحورة. وكذلك فقد أُفيد عن القيام بالتعبير عنه في نباتات التبغ المحورة وراثياً.

---

(10) آلية تنظيمية تؤثر فيها مادة ما من وظيفة بيولوجية محددة بدون أن تكون هذه المادة قد أُنتجت من مركب معني مباشرة بهذه الوظيفة. كما يمكن بهذه الآلية تنظيم عمل أنزيم بواسطة مركبات تزيد أو تنقص من سرعة التفاعل الأنزيمي بحركية مختلفة عن حركيات Michaelis-Menten.



بروتينات الدم
دم
(دم كامل)
طرد مركزي
أ/ب =
بلازما الدم
خلايا الدم
البروتين الرئيسي: الهيموغلوبين
بلازما الدم
65-80g/L
بروتينات
(100%)
تجزئة البروتينات بالهجرة الكهربائية
الألبومين
الغلوبولينات
α1 α2 β γ
60% 4% 8% 12% 16%
لاكتوفيرين
الألبومين الناتج بعد تجزئة الدم
دم الواهب: بلازما الإنسان
ترشيح، إزالة الأملاح بلازما الدم منزوعة الملح
سيفاروز DEAE
pH 4.4: جزء الألبومين
سيفاروز DEAE
pH 5.2: الغلوبولينات المناعية
سيفادكس CM
تحدُّر أيوني
pH 8.1-4.2: بروتينات متنوعة،
pH 5.5: لألبومين
سيفاروز DEAE
pH 4.0: بروتينات سكرية، سيرولوبلازمين (ceruloplasmn)
ترشيح فائق سيفاكريل (Sephacryl)
ألبومين نقي
ألبومين مصل بشري (HSA 1) عند 0.24nm تبيان: خمس جزيئات مرتبطة من حمض الميريستيك (اللون الأحمر)
لاكتوفيرين
بقر محور وراثياً بـcDNA اللاكتوفيرين البشري، مكلون مع عناصر تنظيمية من محضض الكازيئين α S1 البقري
الإستخلاص
إضافة 0.4M من الـNaCl إلى الحليب، إستخلاص بالسيفاروز S
مراقبة النوعية
رسم خريطة الببتيدات، مقياس طيف الكتلة MALDI TOF، هجرة كهربائية ثنائية الأبعاد على الهلام، نمط إضافة لغلايكوزيل
لاكتوفيرين بشري (BJ5 1) عند 0.24nm تبيان شاردتي Fe مُخَلَّبتين (باللون الأحمر)

• عوامل تخثر (تجلط) الدم (Blood clotting agents)

عموميات (General). متى تضررت الأوعية الدموية سواء من الداخل أو الخارج، حصل تخثر الدم؛ وذلك لتجنب المزيد من النزف. هذه العملية المسماة بالإرقاء ـ وقف النزف الدموي ـ (hemostasis) هي منظمة بسلسلة بروتينات معقدة (complex cascade) ذات خطوات متفاعلة فيما بينها تتضمن تفعيل الزايموجين، وتحللاً بروتينياً (proteolysis)، وتثبيط التحلل البروتيني، وذلك من أجل منع تخثر (تجلط) الدم في الكائنات الحية السليمة.

داء الناعور (Hemophilia). لقد عُثر على وصف لمرض الناعور في الألواح الطينية المصرية القديمة. واليوم، يُميَّز بين ثلاثة أمراض رئيسية متفرعة من هذا المرض هي: الناعور أ، الناعور ب، ومرض فون ويلي براند (von Willibrand). يحدث مرض الناعور أ بمعدل 5000:1 عند الذكور فقط، وهو نتيجة عيب في التصنيع الحيوي لمعقد العامل الثامن (factor VIII complex): ففي حالة تشكل كمية تقل عن 1٪ من الكمية الطبيعية لهذا المعقد، يمكن أن يحدث نزيف تلقائي ويكون العمر المتوقع منخفضاً. سبب هذا العيب يبدو أنه غالباً ما يعود إلى انقلاب الانترون F8A (intron) بشكل غير اعتيادي مما يعيق التصنيع الحيوي لمنتج الجين في الكبد. إن جين العامل ثمانية يقع على الصبغي X. وهذا العامل هو عبارة عن بروتين سكري (glycoprotein) (ذو وزن جزيئي يبلغ حوالى 300kDa)، مؤلف من 2332 حمضاً أمينياً في سلسلة ببتيدية منفردة. يبلغ محتواه من السكر حوالى 35٪ مع 25 موضعاً مفترضاً إضافة الغلايكوزيل. كما تم مؤخراً الحصول على نموذج بنيوي له بواسطة تخطيط البلورات إلكترونياً (electron christallography). إن التصنيع الحيوي للعامل الثامن هذا يتم من خلال عملية القطع والوصل لقطعة الـ DNA ذات طول يبلغ حوالى 186 كيلو زوج قاعدي (186kbp) تحتوي على 26 إكسوناً (exon). وخلال إضافة مجموعة الغلايكوزيل في تعديلات ما بعد الترجمة، تكون الإضافة في القطاع B، (B domain) كثيفة؛ لتتم إزالتها لاحقاً أثناء التفعيل بالثرومبين. أما مرض فون ويليبراند فيعود إلى التصنيع الحيوي الخاطئ لعامل فون ويليبراند (vWF) على الجدار الداخلي للأوعية الدموية. تقع جين vWF على الصبغي رقم 12؛ وبالنتيجة يكون تواتر هذا المرض متساوياً عند الرجال والنساء (1:1000). إن بروتين vWF أكبر من العامل الثامن إلا أنه يحتوي على قدر مماثل من الغلايكوزيد. وأثناء عملية تشكله يتحد حتى 100 جزء منفرد ـ مونومير ـ لتكوين بروتين كبير عديد الأجزاء، حيث إن كل مونومير يرتبط بجزيء واحد من العامل الثامن معطياً معقداً من العامل الثامن والـ vWF (VIII:vWF). هذا المعقد يقوم بتسريع تكتل صفيحات الدم بأكثر من 100 ضعف عبر تفعيل نظام العامل العاشر والعامل التاسع أ (Factor X/factor IX_a). في النهاية، يحدث مرض **الناعور ب** بتواتر 25000:1 وبشكل رئيسي عند الرجال. سبب هذا المرض هو عائد للتصنيع الخاطئ للعامل التاسع، وهو بروتين سكري ذو وزن جزيئي قدره 55kDa تقريباً. يساهم العامل التاسع، مثل معقد العامل الثامن، بتفعيل العامل العاشر إلى عامل عاشر مفعل (factor X_a). وتقع جين التي تشفر له على الصبغي X (Xq27) بطول 34 كيلو زوج قاعدي (34kbp).

الكلونة (Cloning). تمت كلونة العامل الثامن (factor VIII) بشكل متزامن تقريباً في كل من شركة جينينتيك ومعهد التركيب الوراثي؛ حيث كانت النسبة المنخفضة من الـ RNA الرسول المنسوخ (فقط 10^{-5} من الـ RNA الرسول الإجمالي في الكبد) التحدي الكبير في عملية الكلونة. في هذه العملية تم الحصول على نسخة الـ DNA المتمم (cDNA) كاملةً تقريباً من خطوط الخلايا الليمفاوية عبر طريقة السير على الجينوم[11]، ثم جرت كلونتها في ناقل يحتوي على عناصر من فيروس SV40 والفيروس الغدي ـ الأدينو فيروس ـ (adenovirus) ليُعبّر عنه بشكلٍ فعال في كل من الخطين الخلويين CHO وBHK[12].

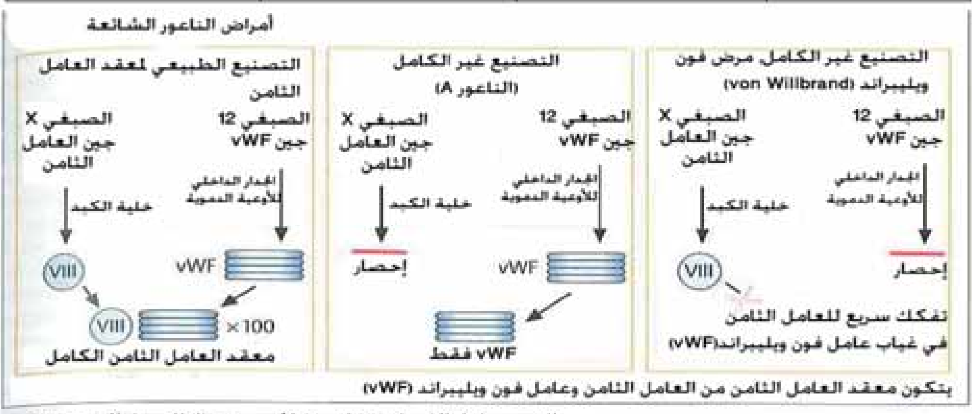
التصنيع (Manufacturing). تم منذ حوالى عام 1964 عزل كل من العامل الثامن والتاسع وفون ويليبراند (vWF) بشكل نقي من الدم بطريقتي الترسيب بالبرودة (cryoprecipitation) والكروماتوغرافيا المناعية التجزيئية، ليجري استخدامها لاحقاً في العلاج بعد تجفيفها (Freeze drying). وبما أنه يلزم بضعة آلاف من المتبرعين بالدم في السنة لتزويد مريض واحد بداء الناعور أ بالعامل الثامن، فإن خطر الإصابة بالفيروسات عالي جداً: أكثر من 60٪. لذلك ومواجهةً لهذه الخلفية، يعتبر التصنيع الناجح منذ عام 1992 للعاملين الثامن والتاسع المأشوبين تجاوزاً كبيراً قاد لمبيعات سنوية تُقدَّر بأكثر من بليون دولار أمريكي. ونظراً إلى درجة إضافة الغلايكوزيل العالية، استخدمت خلايا زرع حيوانية CHO أو BHK كعوائل (مضيفي) إنتاج، في حين أن العطاء بقي منخفضاً جداً، إذ يقدر ببضعة ميلليغرامات لكل ليتر (mg/L) من الزرعة الخلوية.

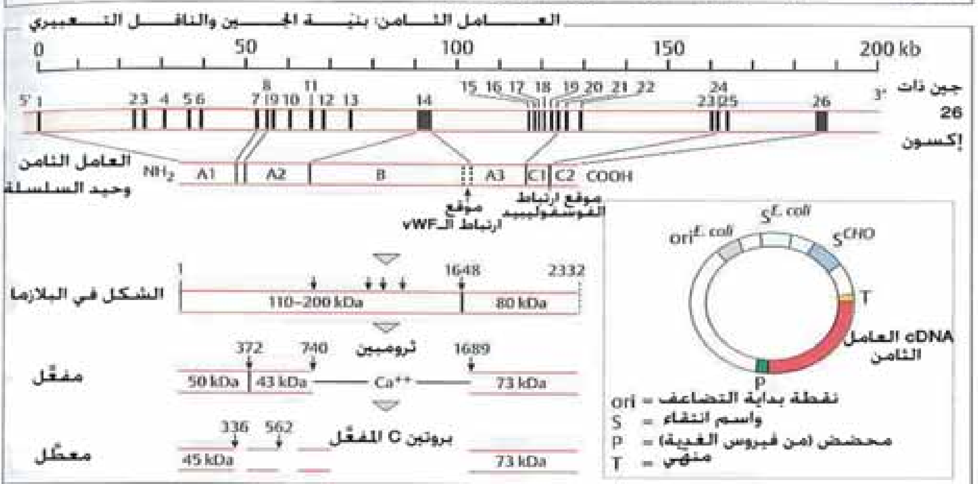
---

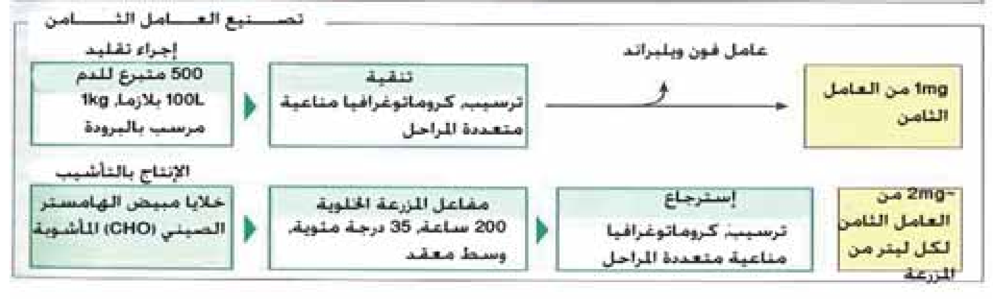
(11) السير على الجينوم: طريقة فعالة وموثوقة للتعرف على مناطق مجهولة من الدنا تجاور منطقة معلومة التسلسل، تقوم على المضاعفة بتفاعل البوليميريز المتسلسل (PCR) بدون الحاجة إلى إنشاء مكتبات دنا.

(12) CHO: خلايا أرومة ليفية من مبيض الهامستر الصيني، وBHK خلايا ورمية من كليات رضيع الهامستر السوري.

أمراض الناعور الشائعة			
	الناعور A	مرض فون ويليبراند	الناعور B
التوريث	5000:1، ذكور فقط	1000:1، رجال ونساء	25000:1، الغالبية رجال
الأعراض السريرية	نزف عند المفاصل والعضلات، نزف دماغي	نزف أنفي، نزف طمثي شديد، نزف الجروح لوقت طويل	نزف مفصلي تلقائي في عمر الطفولة
الموقع	Xq28	12p12	Xq27







• مضادات التخثر (التجلط) والعوامل الحالة للخثرة
(Anticoagulants and thrombolytic agents)

عمـوميـات (General). إن مضادات التخثر (anticoagulants) هي عوامل تمنع من تشكل الخثرة الأولية (كالخثرة التي تنشأ بعد الجراحة). كما أن العوامل الحالة للخثرة تقوم بإذابة الخثرة بآلية التحلل البروتيني. يتم إنتاج مضادات التخثر الهامة من الهيبارين (heparin)، ومشتقات الكومارين (coumarin derivatives)، ومثبطات الثرومبين كالهيرودين (hirudin) أو مضاد الثرومبين ثلاثة (antithrombin III (AT-III)) البشري بواسطة تقنيات الهندسة الوراثية.

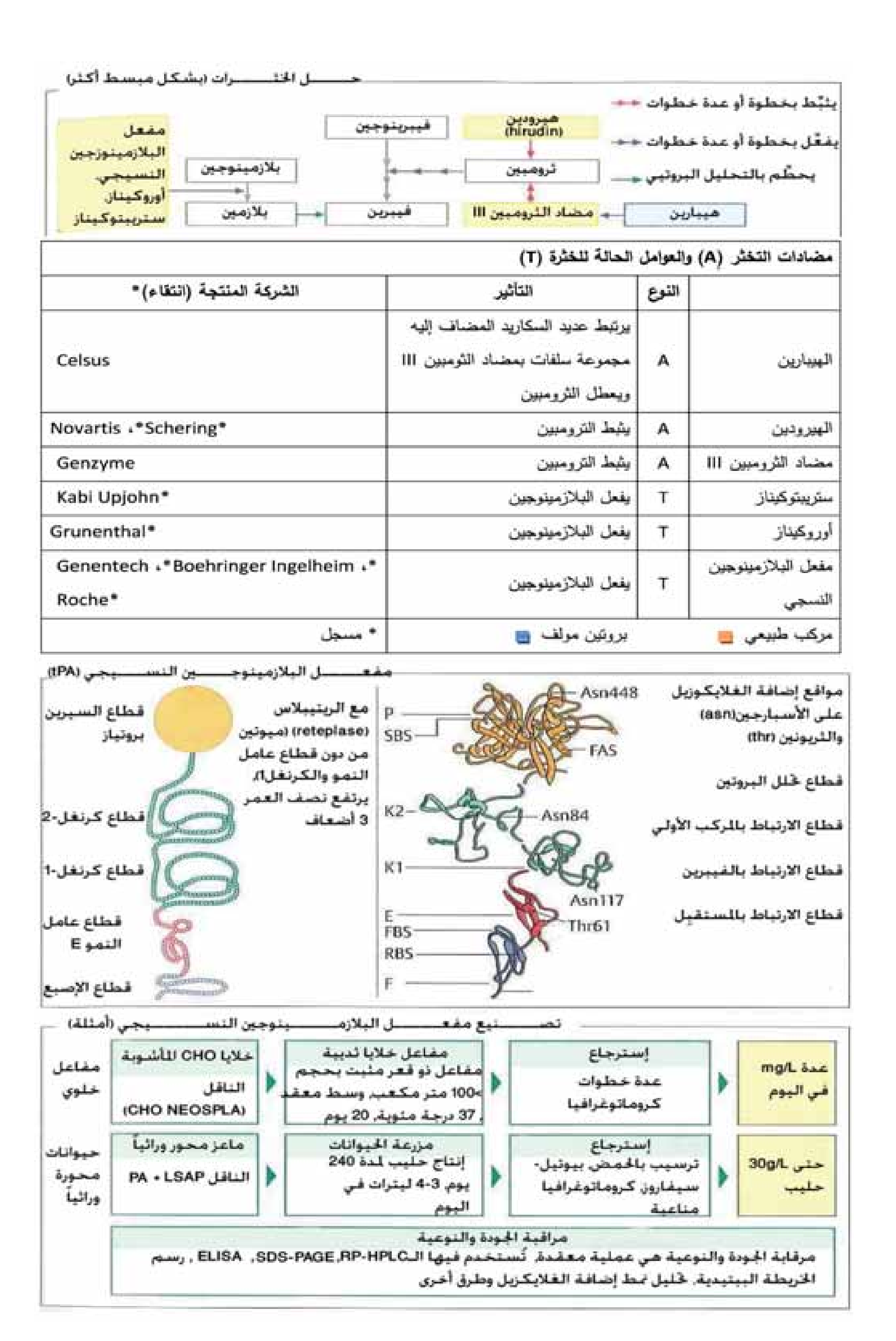
الهيبارين (Heparin) هو غلوكوزأمينوغلوكان مسلفت ذو وزن جزيئي يبلغ 30-60kDa. يمكن الحصول عليه بالاستخلاص من أمعاء الخنزير أو رئة البقر. وهو يُنتج من قبل الخلايا البدينة ليُفرز في بلازما الدم ويُفعِّل الـ AT-III (مضاد الثرومبين ثلاثة) الذي يثبط بدوره تشكل الفيبرين (fibrin) بارتباطه بالثرومبين.

الهيرودين (Hirodin) هو مثبط للثرومبين، تم عزله بالأصل من لعاب العلقات (leeches). لقد جرى التعبير عنه في الـ *E.coli* و *Hansenula polymorpha* بالإضافة إلى كائنات حية مضيفة أخرى؛ وبالتالي، من الممكن إنتاجه بالتخمير (مثل الليبيرودين Lepirudin™). يعمل الهيرودين كالـ AT-III (مضاد الثرومبين ثلاثة)، بحيث يثبط تشكل الفيبرين بارتباطه بالثرومبين.

مفعّل البلازمينوجين النسجي (tPA). إن تفكيك الفيبرين الملاحظ أثناء التآم الجروح يُحفَز بشكل كبير بفعالية بلازمين السيرين بروتياز. إلا أن هذا التفاعل لا يتم إلا إذا تشكل البلازمين من زايموجين البلازمينوجين (zymogen plasminogen) بفعل الـ tPA الذي هو سيرين بروتياز. وبذلك فإن الـ tPA هو عامل حال للتخثر. يبلغ الوزن الجزيئي لهذا العامل 72kDa، وهو يقوم بتحليل الرابطة الببتيدية Arg^{561}-Val^{562} في البلازمينوجين بانتقائية عالية. كما ويشكّل خمسة قطاعات تم اشتقاق وظائفها من تشابه بنيتها مع بروتينات أخرى، بحيث يرتبط قطاعي الكرنغل[(13)] (Kringle domain) بالمركب الأولي من الفيبرين، ويحتوي قطاع البروتياز على المركز الوظيفي للأنزيم. لقد تمت كلونة الـ tPA البشري لأول مرة عام 1982، ومنذ عام 1986 أصبح متاحاً تجارياً. لكن جسور هذا الجزيء الثنائية السُلفيد الثمانية وسلاسل السكر الثلاث الجانبية، التي كان يعتقد أنها أساسية لارتباطه بالمركب الأولي (تشكل تقريباً 5٪ من وزنه الجزيئي)، جعلت التعبير الوظيفي عنه في الـ *E.coli* مستحيلاً. ولهذا، تم إنتاج الأنزيم المأشوب في خلايا CHO، متبوعاً بسلسلة معقدة من خطوات التنقية التي تضم الترسيب، وكروماتوغرافيا التبادل الأيوني وكروماتوغرافيا الألفة المناعية. أما حديثاً، فقد تبين أن طافرات من هذا الأنزيم يمكن أن يُعبَّر عنها بشكل فعّال في *E.coli*. وبالتالي تم تصنيع أنزيم الريتيبلاز (Repilysin®)، الذي هو عبارة عن طافرة لا تحتوي على قطاع الكرنغل 1، ولا على قطاع عامل النمو الظهاري، في المضيف *E.coli*؛ في حين يجب إعادة طيِّه (refold) بعد أن كان متشكلاً في أجسام ضَمينة (inclusion bdies). تُظهر هذه الطافرة زمن بقاء في الدم أكبر بـ 3 ـ 4 أضعاف وهي غير مثيرة للحساسية. وكذلك، لقد حسَّنت طافرة أخرى (TNK-tPA)، تم إنتاجها أيضاً في مضيف الـ *E.coli* وتتضمن تغيير أربعة أحماض أمينية وإزاحة مواقع غلايكوزيدية، انتقائية الـ tPA تجاه الفيبرين، كما أطالت نصف عمره في المصل، ما أتاح استخدامه بجرعة واحدة عوضاً عن التسريب. إضافةً إلى ذلك، أُنتِج الـ tPA أيضاً في حليب حيوانات محورة وارثياً بواسطة ناقل يحوي DNA متمم (cDNA) للـ tPA تمت كلونته خلف محث اللاكتا ألبومين.

عوامل أخرى حالّة للخثرة (Other thrombolytic agents). الأوروكيناز: وهو عبارة عن سيرين بروتياز يتم تصنيعه في الجهاز البولي التناسلي، ويتكون على شكل بادئة أوروكيناز (prourokinase) في البلازما والبول. مثلما يفعل الـ tPA، يقوم الأوروكيناز بتحليل (hydrolysis) البلازمينوجين إلى بلازمين، كما يمكن تنقية نوعين منه يمتلكان نفس الفعالية البيولوجية (54kDa و30kDa) بشكل منفصل؛ حيث ينشأ النوع الأخف من النوع الأثقل بالتحلل الذاتي (autolysis). يمكن تحضير الأوروكيناز من البول باستخدام مزارع كلوية بشرية، أو من الـ *E.coli* المأشوبة. أما الستريبتوكيناز (streptokinase) فهو بروتين غير فعال تحفيزياً، ذي وزن جزيئي قدره 45kDa، حيث إن بعض الـ Streptococci تقوم بتشكيله. عند ارتباطه بالبلازمينوجين، فإنه يحرض حدوث تغير في شكل هذا الأخير ما يؤدي إلى تفكك البلازمين بالتحلل الذاتي. يتم الحصول على الستريبتوكيناز من طافي مزارع الـ Streptococci ويُنقى بعمليات كروماتوغرافية. وفيما تكون كلفة إنتاج هذا العامل الحال للخثرة مقبولة، إلا أنه يتضمن خطر التفاعلات المناعية.

(13) مناطق بروتينية تنثني بشكل عروات تساعد في تثبيتها روابط كبريتية مزدوجة. لهذه المواقع أهمية في تآثر بعض البروتينات مثل عوامل تخثر الدم. عثر على هذه البنى في البلازمينوجين وبعض عوامل النمو والبروترومبين والأبوليبوبروتين أ. أُطلقت عليها تسمية (Kringle) بسبب الشبه بين شكل هذه البنية وأحد أنواع الحلويات المعروفة في الدنمارك بنفس الاسم.



مضادات التخثر (A) والعوامل الحالة للخثرة (T)

	النوع	التأثير	الشركة المنتجة (انتقاء)*
الهيبارين	A	يرتبط عديد السكاريد المضاف إليه مجموعة سلفات بمضاد الثومبين III ويعطل الثرومبين	Celsus
الهيرودين	A	يثبط الترومبين	Novartis ،*Schering*
مضاد الثرومبين III	A	يثبط الثرومبين	Genzyme
ستريبتوكيناز	T	يفعل البلازمينوجين	Kabi Upjohn*
أوروكيناز	T	يفعل البلازمينوجين	Grunenthal*
مفعل البلازمينوجين النسجي	T	يفعل البلازمينوجين	Genentech ،*Boehringer Ingelheim ،* Roche*
مركب طبيعي ■		بروتين مولف ■	* مسجل

• مثبطات الأنزيمات (Enzyme inhibitors)

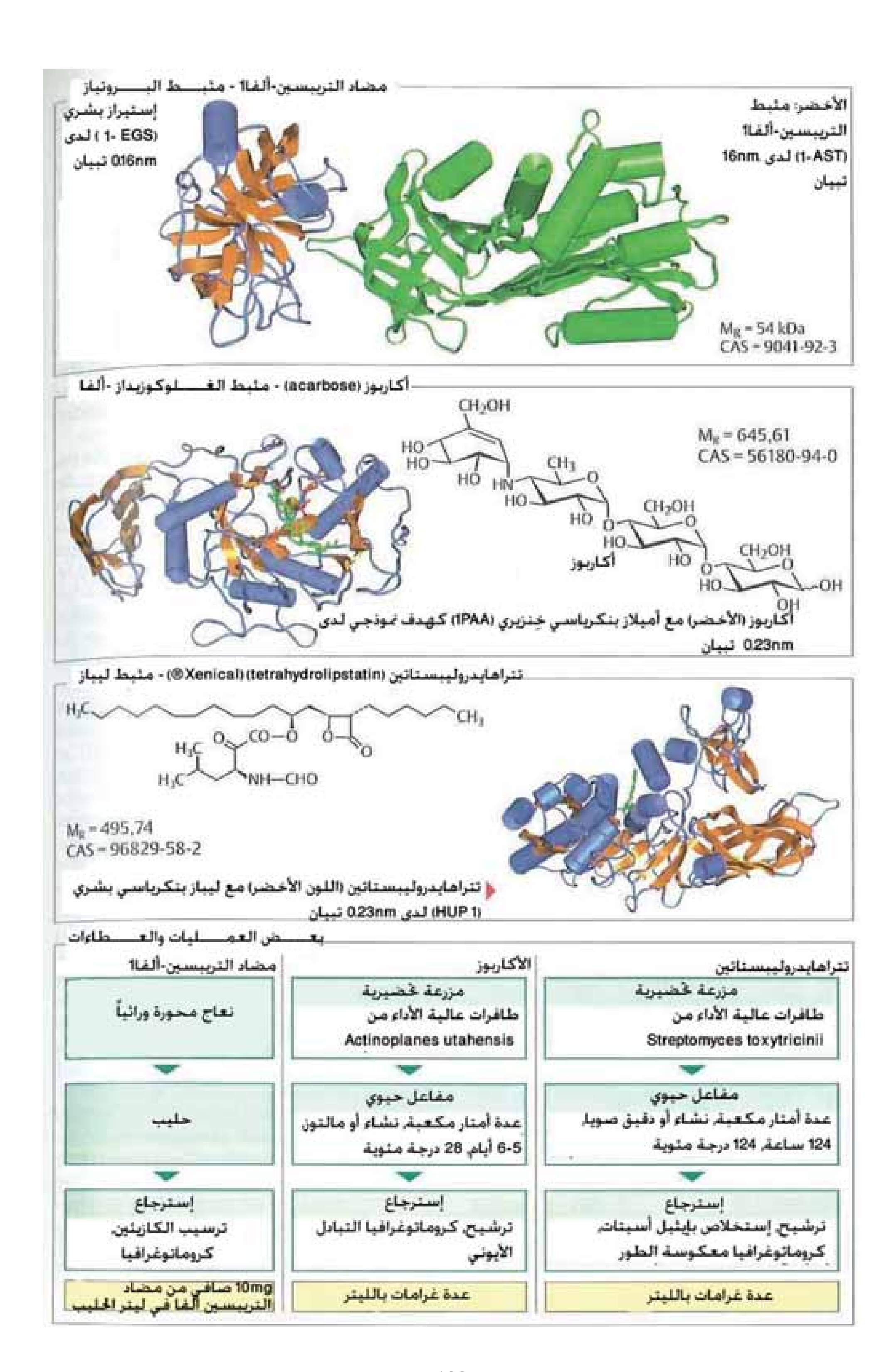
عموميات (General). لقد وجدت مثبطات الأنزيمات مكاناً وطيداً لها على الصعيد العلاجي. على سبيل المثال، يُستخدم الأبروتينين (aprotinin)، وهو مثبط لأنزيم البروتياز يتم الحصول عليه من الأنسجة البقرية، في علاج التهاب البنكرياس أو الصدمة (shock). كما يمكن مستقبلاً استخدام مضاد التريبسين ألفا-1، (α1-antirypsin) في علاج الانتفاخ الرئوي (emphysema). وبالرغم من عدم إيجاد استخدام علاجي بعد لمثبطات البروتياز ذات المنشأ الميكروبي مثل اللوبيبتين (leupeptins)، والبيبستاتين (pepstatin)، والأنتيباين (antipain)، والكيموستاتين (chemostatin) والإلاستينال (elastinal). إلا أن المستقلب الميكروبي الأكاربوز (acarbose)، وهو مثبط الغلايكوزيداز (glycosidase)، يعد من مضادات داء السكري القيمة. كما وُجد للتيتراهيدروليبستاتين (tetrahydrolipstatin)، وهو مشتق كيميائي من المستقلب الميكروبي ليبستاتين (lipstatin)، استخدامات واسعة في علاج السمنة حيث إنه يثبط اللبياز (lipase) البنكرياسي لدى الانسان.

الأبروتينين (Aprotinin) وهو عبارة عن عديد ببتيدي (polypeptide) مبني من 48 حمضاً أمينياً (ذو وزن جزيئي يبلغ 6511Da)، يقوم بتثبيط أنزيمات مختلفة من البروتياز كالتريبسين (trypsin)، والكيموتريبسين (chemotrypsin)، والبلازمين (plasmin) (مثبط التريبسين البنكرياسي (pancreatic trypsin inhibitor (PTI))، حيث تبلغ قيمة ثابت تثبيطه للتريبسين، K_i، حوالى 10^{-11}M. يستخدم الأبروتينين (الترازيلول ®(Trasylol®)) في علاج التهاب البنكرياس، وفي حالات النزيف الشديد، والصدمة، وزرع الأعضاء - الازدراع - (transplantation). كما يبقى تطبيق آخر له في التخمير باستخدام خلايا ثديية، حيث يمكن للأبروتينين أن يمنع تحلل البروتينات المأشوبة التي يتم فرزها داخل الوسط. أما بالنسبة إلى عزله فيتم باستخلاص البنكرياس أو الرئات البقرية، الذي يتبعه تنقية بالكروماتوغرافيا. وحيث إنه لا تتم إضافة مجموعة غلايكزيل عليه، فإنه يمكن التعبير عنه بشكل فعّال وظيفياً في خلايا الـ *E.coli* المضيفة.

مضاد التريبسين ألفا 1، (α 1-antirypsin). يُشفَّر عن هذا البروتين السكري (glycoprotein) الضخم (ذو وزن جزيئي يبلغ 54kDa) على الصبغي 14 (14q32). وهو يُصنَّع في الكبد ويجول في مصل الدم بتركيز $2gL^{-1}$ تقريباً، ما يفوق الـ 90٪ من كمية الغلوبولين ألفا -1) (α1-globulin) الموجودة في الدم. يقوم هذا البروتين بتثبيط الإلاستاز (elastase)، وهو بروتياز يُفرَز من قبل العدلات المحبَّبَة (neutrophilic granulocytes) في الجهاز المناعي، مما يمنع التحلل البروتيني (proteolysis) للنسيج الرئوي، المكون بشكل كبير من الإلاستين. ونتيجة لخلل وراثي يحدث بشكل مسيطر في شمال أوروبا، فإنه يُطفَّر مضاد التريبسين هذا (α AT) في الموقع 53 (يتحول اللايزين lys[53]، Z («Z-type»)، إلى حمض الغلوتاميك ليعطي النمط ما ينتهي إلى تراجع كبير في إفرازه من خلايا الكبد، وبالتالي إلى مستوى في مصل الدم يعادل الـ 15٪ من قيمته الطبيعية فقط. ونتيجة لذلك، يبدأ أنزيم الإلاستاز بتحليل نسيج الرئة ليؤدي إلى انتفاخ رئوي (emphysema) مهدد للحياة ولمتلازمة الضائقة التنفسية عند البالغين (adult respiratory distress syndrome) التي تكون عادة مميتة. في حين أن المدخنين من أصحاب طافرة النمط Z في الـ α، AT هم في حالة خطر خاصة، وذلك لأن مركبات من دخان التبغ تقوم بأكسدة الميثيونين رقم 358 met[358]، الأساسي لتثبيط الإلاستاز. يمكن تأخير تطور المرض عن طريق حقن المثبط وريدياً (حوالى 200g لكل مريض سنوياً)، إذ يتم الحصول عليه بشكل أساسي من خلال تجزئة (fractionation) بلازما الدم من المتبرع. كما ويحضر بشكل مأشوب في الـ *Saccharomyces cerevisia* لاحتياجه إلى إضافة معقدة لمجموعات الغلايكوزيل (glycosylation)، وليس في الـ *E.coli*. أما البديل الأكثر جاذبية من الناحية المادية فيتمثل بالتعبير عن هذا البروتين السكري المأشوب كمنتج مندمج مع بيتا - لاكتوغلوبولين، يتم إفرازه في حليب نِعاج محورة وراثياً.

الأكاربوز (غلوكوباي) (Acrbose (Glucobay®). عبارة عن رباعي سكاريد زائف (pseudotetrasacharide) تنتجه سلالة الأكتينومايسس *Actinoplanes utahensis* (Actenomyces)، وهو مثبط تنافسي (competitive) لأنزيمات الانفرتاز (invertase)، والمالتاز (maltase)، والألفا - والبيتا - أميلاز β ,-α)، بالإضافة إلى العديد من أنزيمات الغلوكوزيداز (glucosidases) المختلفة. يقوم هذا المثبط بتخفيض المحتوى من الغلوكوز في الجهاز الهضمي، ولذلك فهو يستخدم كدواء مضاد لكل من داء السكري وتشكل الدهون (anti-adiposis) بتناوله عن طريق الفم. يبلغ مستوى مبيعاته سنوياً الـ 300 مليون دولار أمريكي. وهو يُصنع بالتخمير الميكروبي، كما تمت كلونة جينات مختلفة تتدخل في تصنيعه حيوياً.

الليبستاتين (Lipstatin) عبارة عن إستر (ester) محب للدهون (lipophilic) مع سلسلة متوسطة من حلقة البيتا - لاكتون (ring) وسلسلة جانبية من N - فورميل - L - لوسين -N) formyl-L-leucine)، تنتجه *Streptomyces toxytricinii.* وهو يتحول بهدرجة (hydrgenation) محفزة إلى تتراهيدروليبستاتين (tetrahydrolipstatin) (زينيكال ®، (Xenical®)). يرتبط المركبان المؤلفان لهذا المثبط تشاركياً (covalently) إلى ثمالة السيرين (serine residue) في الموقع الفعال (active site) للعديد من أنزيمات الليباز (lipase)، بحيث يعطل الليباز البنكرياسي بعد تناوله عن طريق الفم ما يؤدي الى تثبيط تحلل (hydrolysis) الشحوم الثلاثية (triglyceride) بدون أن يؤثر في تناول الأحماض الدهنية. لذلك يستخدم التتراهيدروليبستاتين في علاج السمنة. أما قيمة مبيعاته فتقدر ببضعة مئات ملايين الدولارات الأمريكية.



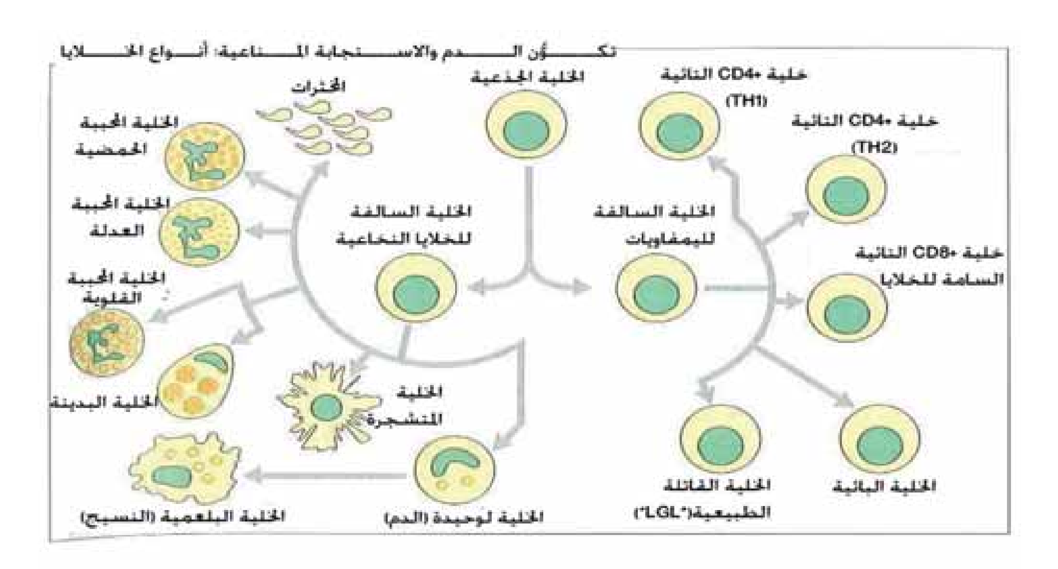
مضاد التريبسين-ألفا1 - مثبط البروتياز
إستيراز بشري (EGS -1) لدى 0.16nm تبيان
الأخضر: مثبط التريبسين-ألفا1 (AST-1) لدى 16nm تبيان
M_R = 54 kDa
CAS = 9041-92-3
أكاربوز (acarbose) - مثبط الغلوكوزيداز-ألفا
M_R = 645,61
CAS = 56180-94-0
CH_2OH
HO
HO
HO
HN
CH_3
O
HO
HO
O
CH_2OH
O
HO
HO
O
CH_2OH
O
HO
OH
OH
أكاربوز
أكاربوز (الأخضر) مع أميلاز بنكرياسي خنزيري (1PAA) كهدف نموذجي لدى 0.23nm تبيان
تتراهايدروليبستاتين (tetrahydrolipstatin) (®Xenical) - مثبط ليباز
H_3C
CH_3
O
CO—O
O
O
H_3C
H_3C
NH—CHO
M_R = 495,74
CAS = 96829-58-2
تتراهايدروليبستاتين (اللون الأخضر) مع ليباز بنكرياسي بشري (HUP 1) لدى 0.23nm تبيان
بعض العمليات والعطاءات
مضاد التريبسين-ألفا1
نعاج محورة وراثياً
حليب
إسترجاع
ترسيب الكازيئين، كروماتوغرافيا
10mg صافي من مضاد التريبسين ألفا في ليتر الحليب
الأكاربوز
مزرعة تحضيرية
طافرات عالية الأداء من Actinoplanes utahensis
مفاعل حيوي
عدة أمتار مكعبة، نشاء أو مالتوز 5-6 أيام، 28 درجة مئوية
إسترجاع
ترشيح، كروماتوغرافيا التبادل الأيوني
عدة غرامات بالليتر
تتراهايدروليبستاتين
مزرعة تحضيرية
طافرات عالية الأداء من Streptomyces toxytricinii
مفاعل حيوي
عدة أمتار مكعبة، نشاء أو دقيق صويا، 124 ساعة، 124 درجة مئوية
إسترجاع
ترشيح، إستخلاص بإيثيل أسيتات، كروماتوغرافيا معكوسة الطور
عدة غرامات بالليتر

• الجهاز المناعي (The immune system)

عموميات (General). يقوم الجهاز المناعي بحماية الكائنات الحية العليا من الإصابات، كما أنه يؤمن لها المناعة تجاه العديد من المُمرضات (pathogens). وهو يتكون من خلايا متخصصة (خلايا الاستجابة المناعية) ورسل كيميائية تؤمن الاتصال مع الخلايا المتخصصة (نظام المناعة الظرفي (humoral immune system)). تحطم الخلايا المناعية السامة خلوياً (cytotoxic) العوامل الممرضة التي غزت الجسم وكذلك الخلايا الأهلية (native) للكائن الحي التي تحطمت بشكل غير عكوس (موت الخلايا المنظم (apoptosis)). كما أنها تساهم في الدفاع المناعي ضد الأعضاء المزدرعة (transplanted organs). وللتأقلم مع تغيرات الظروف البيئية، يُظهر الجهاز المناعي مرونة كبيرة محددة وراثياً. يمكن للتضليل أن يؤدي إلى مجموعة واسعة من الأمراض مثل عجز الاستجابة المناعية، الأرجية (الحساسية)، أمراض المناعة الذاتية وتنكس خبيث (malignant degeneration). إن الجهاز المناعي يمكن أن ينظَّم بواسطة العديد من الرسل البروتينية (كالسيتوكينات (cytokines) وعوامل النمو) التي يمكن إنتاج معظمها على شكل بروتينات مأشوبة (recombinant) التي يتم تقييمها للاستخدام العلاجي.

أنواع الخلايا (Cell types). تتشكل الخلايا الجذعية المشكلة للدم (hematopoetic stem cells) في النخاع العظمي، حيث تتمايز (differentiate) إلى خلايا جذعية نخاعية (myeloic) وخلايا جذعية لِمفية (lymphatic). تنشأ من الأولى خلايا الدم الحمراء، والخلايا المحببة (granulocytes)، والخلايا البلعمية (macrophages) بالإضافة إلى أنواع خلوية أخرى. بينما تنشأ من الخلايا الجذعية اللمفية اللمفاويات التي تهاجر نحو الدم والنظام اللمفي (lymph system). يمتلك البالغ المعافى حوالى 10^{12} من هذه اللمفاويات «الغِرّ» (naïve) (أي تلك التي لم تلتق بعد بأي مستضد (antigen)). ومتى تم تفعيل الخلية اللمفية بمستضد (وببضعة إشارات أخرى)، فإنها تشكل، من خلال التضخم المُكلون (clonal expansion)، عدداً كبيراً من الخلايا النوعية (المتخصصة) بهذا المستضد. تتمايز الخلايا اللمفية بشكلٍ إضافي لتعطي اللمفاويات البائية (B lymphocytes) واللمفاويات التائية (T lymphocytes)، وعندما تنضج الخلايا البائية في النخاع العظمي، أو العقد اللمفية أو الطحال، فإنها تشكل أجساماً مضادة لدى التقائها بالمستضد (الاستجابة المناعية الظرفية humoral immune (response). في المقابل، تنضج الخلايا التائية في التيموس ـ الغدة الصعترية ـ (thymus)، حيث تتمايز لدى التقائها بجزيئات معقد التوافق النسيجي الأساسية major (histocomptability complex (MHC))، وهو معقد بروتيني من الغشاء الخلوي معروض على سطح الخلية. وهكذا يشكل معقد الـ MHC والخلية التائية (MHC-T-Cell complex) بنى سطحية محددة تتميز بوظيفتها. إن الخلايا التائية هي الحوامل الرئيسية للاستجابة المناعية الخلوية، وذلك بإفرازها سيتوكينات (cytokines) مختلفة. مثلاً، يمكن للخلايا المساعدة التائية (T helper cells) أن تفرز إنترلوكينات (interleukins) مختلفة، وبالتالي تقوم بتفعيل وتضخيم ومُمايِزة الخلايا البائية. فهذه الخلايا موسومة بالبروتين السكري CD4 الموجود على سطحها. أما الخلايا اللمفية التائية السامة للخلايا (cytotoxic T lymphocytes) فتحمل على سطحها البروتين السكري CD8، وهي يمكن أن تحلل (lyse) خلايا مصابة فيروسياً، وأن تفرز عدة مواد من بينها السيتوكينات كالانترفيرون غاما (interferon-α) والليمفوتوكسين ألفا (lymphotoxin-α).

الاستجابة المناعية والسيتوكينات (Immune response and cytokines). تختلف الاستجابة المناعية ضد الإصابات تبعاً لطبيعة العامل الممرض أهو فيروس، بكتيريا أم طفيلي (parasite). يتم بداية تعليم (وسم) العوامل الممرضة الخارج خلوية (extracellular) والمواد السامة التي تفرزها (toxins) بالأجسام المضادة، مما يثير سلسلة من الأحداث (cascade) التي تؤدي إلى بلعمتها (endocytosis) وتفكيكها بالخلايا البلعمية (macrophages). أما العوامل الممرضة الداخل خلوية (intracellular)، مثل المايكوبكتيريا (mycobacteria) أوالفيروسات، فتُحطَّم بآليات مختلفة (مشابهة لإزالة الخلايا المحوَّلة (transformed cells)): إذ حالما تصيب هذه العوامل إحدى الخلايا البلعمية الموجودة في كل مكان، تَعْرُض هذه الأخيرة الشدف المُحلَّلة (lysed fragments) من العامل الممرض/الخلية على سطحها، ما يُطلِق فعالية سلسلة من المعقَّدات (complex cascades) التي تؤدي إلى تحطيم الخلايا المصابة، وذلك بواسطة الخلايا اللمفية التائية السامة للخلايا (cytotoxic T lymphocytes). وكذلك، تَتبَع أمراض المناعة الذاتية (autoimmune deseases) آلية مشابهة. على سبيل المثال، في النوع الأول من داء السكري، يتم تعديل بروتينات خلايا البنكرياس بيتا β، مما يؤدي إلى التعرف عليها خطأً كبروتينات غريبة، وبالتالي يتم تحطيمها بواسطة الخلايا اللمفية CD8. كما ويتأثر تنسيق الاستجابة المناعية بشكل كبير بالسيتوكينات ومستقبلاتها الموجودة على سطح خلايا الجهاز المناعي. إن تنظيم الاستجابة المناعية أمر معقد للغاية؛ حيث إن منظِمات النمو النوعية (المتخصصة) بالخلايا ومستقبلاتها (receptors) يتم تحديدها بطريقة عالية التخصص، أي أن خلايا في الجهاز المناعي يجب أن تُصنَّع في وقت معين. وقد أدى قدوم الهندسة الوراثية إلى إمكانية إنتاج سيتوكينات وعوامل نمو كبروتينات مأشوبة (recombinant)، مما أطلق حقبة جديدة من البحث الطبي، وفي بعض الحالات إمكانيات جديدة في العلاج الطبي.



السيتوكينات وعوامل النمو (انتقاء)			
الوظيفة العامة	**النوع**	**من النوع الخلوي**	**المستهدفات والتأثيرات**
تفعيل الخلايا اللمفية	انترلوكين-2 (interleukin-2)	T_H1, (CTL)	الحض على نمو الخلايا التائية
	انترفيرون غاما (interferon-γ)	T_H1, CTL	تفعيل الخلايا البلعمية
	انترلوكين-4	T_H2	تفعيل الخلايا البائية، الحض على نمو الخلايا التائية والبائية
	انترلوكين-3	الخلايا التائية المساعدة 1 و2 والخلايا التائية السامة للخلايا (T_H1, T_H2, (CTL))	تنشيط نمو الخلايا السالفة المكوّنة للدم
التهاب موضعي	انترلوكين 9	الخلايا التائية	زيادة فعالية الخلايا البدينة
	انترفيرون ألفا	الكريات البيضاء، الأرومة الليفية	زيادة التعبير عن جزيئات معقد التوافق النسيجي الرئيسي – الصنف الأول(MHC I)
	عامل نخر الورم ألفا (TNF-α)	الخلايا البلعمية، الخلايا القاتلة الطبيعية	التسبب بتفاعلات التهابية موضعية
تأثيرات جهازية ونوعية في النخاع العظمي	انترلوكين-1 ألفا انترلوكين-1 بيتا	أنواع خلايا مختلفة	التسبب بحمى، الحض على نمو الخلايا السالفة المكوّنة للدم
	انترلوكين 6	T_H2، الخلايا البلعمية	تحرير بروتينات الطور الحاد(acute-phase proteins)
	ايريثروبويتين	الكلية	تنشيط نمو أرومات الحمر
	عامل تفعيل مستعمرات المحببات والبلعميات	T_H1, (T_H2), (CTL)	زيادة توليد الخلايا المحببة، الخلايا البلعمية والخلايا المتشجرة

الإمكانات العلاجية للسيتوكينات وعوامل النمو	
الإصابات	علاج الورم
الصدمة	أمراض مناعة ذاتية
خلل في الجهاز المناعية	تفاعلات الحساسية
خلل في نمو الخلايا	طلب الازدراع (زراعة الأعضاء)

• الخلايا الجذعية (Stem cells)

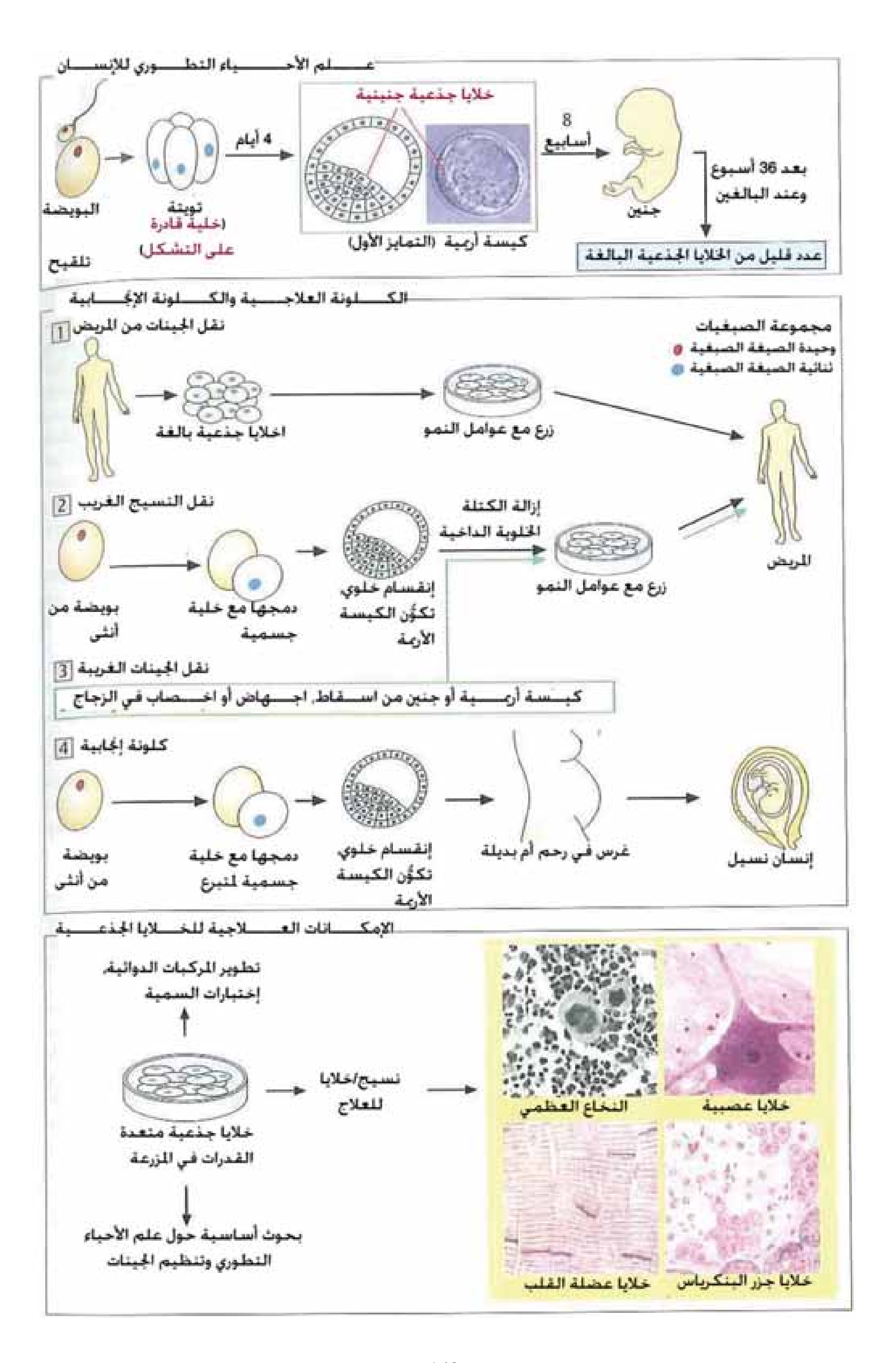
عموميات (General). تملك الخلايا الجذعية القدرة على الانقسام بشكل مستمر في المزرعة، وكذلك القدرة على التطور إلى أنواع مختلفة من الخلايا المتخصصة. تظهر الخلايا الجذعية الجنينية ((embryonic stem cell (ESC)) في البويضة المخصبة خلال طور مبكر من التطور، وتظهر الخلايا الجذعية البالغة (adult stem cells) في غالبية أنسجة الحيوانات أو البشر البالغين. إن الخلايا الجذعية هي أداة مهمة في الأبحاث الأساسية، حيث يمكن أن توضح الأحداث الجزيئية التي تتم أثناء التطور. كما يمكن أن يكون لديها إمكانيات علاجية كبيرة في علاج الأمراض المرتبطة بالأنسجة أو الأعضاء (العلاج الخلوي (cell therapy)).

الخلايا الجذعية الجنينية (Embryonic stem cells (ESC)). إن جميع الخلايا المتطورة من بويضة مخصبة تمتلك في طورها المبكر (التويتة (morula)) القدرة على التمايز إلى أي نوع من الخلايا المختصة (خلايا قادرة على التشكيل (totipotent)). والتوائم المتجانسة الزايجوت (homozygous) هي النتيجة الطبيعية لخليتين قادرتين على التشكيل انفصلتا من نفس التويتة. بعد حوالى أربعة أيام من الإخصاب، تتطور التويتة إلى كيسة أريمية (blastocyst) ذات خلايا داخلية قادرة على التحول إلى كائن كامل (multi/pluripotent) ـ أي قابلة لأن تشكل مدى واسعاً من أنواع الخلايا المختلفة ـ وخلايا خارجية كانت قد بدأت بالتمايز (differentiation). وبعد الانقسام الخلوي اللاحق، تشكل الخلايا الداخلية مخزوناً من الخلايا الجذعية الجنينية ((embryonic stem cells (ESC)) المتعددة القدرات (multipotent) والقادرة على التمايز إلى مدى واسع من الخلايا المتخصصة، مثل، خلايا النخاع العظمي، أو الأعصاب أو عضلة القلب. يكتمل هذا التطور عند الجنين البشري بعد ثمانية أسابيع تقريباً؛ حيث تكون غالبية الخلايا الجذعية الجنينية قد تمايزت. نتيجة لذلك، يمكن عزل الخلايا الجذعية الجنينية 1) من الكيسة الأريمية البشرية التي تولدت بالإخصاب في الزجاج (*in vitro fertilization*) لزوجين عقيمين ولكن لم يتم بعد غرسها؛ 2) من نسيج جنيني بعد الإسقاطات أو الإجهاضات، 3) بنقل نواة أي خلية بشرية ثنائية الصيغة الصبغية (diploid) إلى بويضة بشرية منزوعة النواة وزرعها للوصول إلى مرحلة الكيسة الأريمية (انظر أيضاً فصل «الحيوانات المستنسخة»).

الخلايا الجذعية البالغة (Adult stem cells). يحتوي النخاع العظمي لدى الأطفال، وحتى لدى البالغين، على خلايا جذعية متعددة القدرات (multipotent stem cells)، تصل بأعداد قليلة إلى جهاز الدوران (circulatory system) وتتمايز إلى أنواع مختلفة من خلايا الدم. حديثاً، تم العثور أيضاً على خلايا جذعية في عدة أنسجة أخرى عند الانسان البالغ، مثلاً، الخلايا الجذعية العصبية التي وُجِدت في عينات دماغ مشرح. واعتماداً على التجارب المجراة على الحيوانات، يعتقد حالياً أنه إذا تم زرع خلايا جذعية لدى الإنسان البالغ في نوع مختلف من الأنسجة، فإنه يمكن أقلمة تمايزها مع النسيج المضيف، سالكة بذلك سلوكاً مشابهاً للخلايا المتعددة القدرات. إن الميزة الكبيرة للخلايا الجذعية البالغة تكمن في مواءمتها المناعية (immunocomptability) حيث إن المتبرع والمستقبِل هما نفس الشخص. إلا أن عزلها أصعب بكثير من عزل الخلايا الجذعية الجنينية. إضافة إلى امتلاكها العيوب الخلقية أو المكتسبة من قبل المتبرع. لذا، يبدو حالياً أن للخلايا الجذعية الجنينية إمكانية تطبيق أوسع من الخلايا الجذعية البالغة.

التطبيقات (Applications). تسمح الخلايا الجذعية الجنينية ((embryonic stem cells (ESC)) بتنفيذ بحوث أساسية حول الأسس الجزيئية لتمايز الخلايا (cell differentiation). إضافة إلى أنها تمثل أداة قيمة لدراسة الحالات الممرضة، مثل، العيوب الخلقية أو الأورام. كما يمكن أن تنفع في تطوير مدى واسع من الخطوط الخلوية البشرية الأكثر فائدة في اختبار فعالية الأدوية وأمانها على المستوى الجزيئي. وفي النهاية، يفتح استخدامها إمكانية علاج أمراض عبر العلاج الخلوي (cell therapy). على سبيل المثال، يمكن لزرع خلايا جزر البنكرياس التي تم الحصول عليها من زراعة الخلايا الجذعية في مزارع نسيج البنكرياس أن تشفي بشكل دائم أطفال يعانون النوع الأول من داء السكري. إلا أنه يجب الإشارة إلى أن العديد من الأسئلة أو المشاكل التقانية مازالت بلا حلول، مثل مسألة التمايز الموثوق للخلايا الجذعية الجنينية في الزجاج ومواءمتها المناعية مع المضيف.

الاعتبارات الأخلاقية. يبقى السؤال إن كانت الحياة البشرية قد بدأت فعلاً في مرحلة الخلايا المتعددة في البويضة المخصبة كالتويتة (morula) أو الكيسة الأريمية (blastocyte)، التي تخضع لحماية قانونية، مسألة خلافية تخضع لمناقشات أخلاقية. تم التوصل في الولايات المتحدة الأمريكية وغالبية البلدان الصناعية، إلى قبول محدود بالأبحاث المجراة على الخلايا الجذعية الجنينية (embryonic stem cells) في الاستنساخ ـ الكلونة ـ العلاجية (therapeutic cloning)، الأمر الذي يسير بالتوازي مع الأبحاث التأكيدية لاستنساخ الخلايا الجذعية البالغة (adult stem cells) واستخدامها في العلاج.


علم الأحياء التطوري للإنسان
خلايا جذعية جنينية
4 أيام
8 أسابيع
البويضة
توتة
(خلية قادرة على التشكل)
تلقيح
كيسة أرمية (التمايز الأول)
جنين
بعد 36 أسبوع وعند البالغين
عدد قليل من الخلايا الجذعية البالغة
الكلونة العلاجية والكلونة الإنجابية
1 نقل الجينات من المريض
مجموعة الصبغيات
وحيدة الصيغة الصبغية
ثنائية الصيغة الصبغية
اخلايا جذعية بالغة
زرع مع عوامل النمو
2 نقل النسيج الغريب
إزالة الكتلة الخلوية الداخلية
بويضة من أنثى
دمجها مع خلية جسمية
إنقسام خلوي تكوُّن الكيسة الأرمة
زرع مع عوامل النمو
المريض
3 نقل الجينات الغريبة
كيسة أرمية أو جنين من اسقاط، اجهاض أو اخصاب في الزجاج
4 كلونة إنجابية
بويضة من أنثى
دمجها مع خلية جسمية لمتبرع
إنقسام خلوي تكوُّن الكيسة الأرمة
غرس في رحم أم بديلة
إنسان نسيل
الإمكانات العلاجية للخلايا الجذعية
تطوير المركبات الدوائية، إختبارات السمية
خلايا جذعية متعددة القدرات في المزرعة
نسيج/خلايا للعلاج
بحوث أساسية حول علم الأحياء التطوري وتنظيم الجينات
النخاع العظمي
خلايا عصبية
خلايا عضلة القلب
خلايا جزر البنكرياس

• هندسة الأنسجة (Tissue engineering)

عموميات (General). تهدف هندسة الأنسجة إلى تجديد وظائف الأنسجة بغرس النسيج المزروع في الزجاج (in vitro). لقد أُتبعت الجهود الأولى المبذولة لاستبدال الجلد في علاج الحروق بهندسة نسيج العظام، والأوعية الدموية، والكبد، والغضاريف، والقرنية، والعضلات والخلايا العصبية؛ في حين تلعب القوالب الموائمة حيوياً (bicompatable) والخلايا الجذعية الموجودة في كل مكان (omnipotent stem cells) دوراً هاماً في هذا المجال البحثي.

المقاربات التقليدية (Traditional approaches). يتم في التطعيم الذاتي (autografting) ازدراع (زرع) نسيج عند نفس المريض من مكان إلى آخر. على سبيل المثال، استخدام أوردة الساق في تطعيم تحويلات الشريان التاجي (Coronary bypasses) (حوالى 300000 عملية في السنة في الولايات المتحدة)، أو تطعيم عظم قطعة من فقرات الظهر (spine segment) باستخدام عظم الورك. وبالرغم من أن هذا الإجراء لا يسبب مشاكل مناعية إلا أنه مكلف ومؤلم. أما في التطعيم المثلي (allografting) فيتم ازدراع نسيج أو أعضاء (قلب، كلية، كبد، عظم، بنكرياس، الخ) مأخوذة من متبرع غريب (من شخص متوفي مثلاً). ومع ظهور كابحات المناعة (immunosupressives)، أصبحت هذه التقانة تُستخدم بشكل واسع (أكثر من 22000 عضو مزدرع في الولايات المتحدة في عام 1998 و780 كبداً مزدرعاً في ألمانيا عام 2000). كما تستخدم مواد وأدوات اصطناعية بشكل واسع، في الصمامات الاصطناعية، أو الجراحات الترقيعية (prosthetics) للورك والركبة أو اغتراس الثدي على سبيل المثال.

تجدد النسيج الموجَّه بسقالة (Scaffold-guided tissue regeneration). تمثل القوالب الخارج خلوية الأجزاء المحددة لهيئة وشكل جسم الانسان، مثل مركب الكولاجين الليفي للعظام. لقد استخدمت سقالات اصطناعية مثل السيراميك، أو أنابيب الكولاجين أو مواد مصنعة (أفلام، أغشية، إسفنجات، حبيبات (beads)) لزراعة خلايا المتبرِّع، التي يمكن أن تنمو على هذه السقالة بوجود عوامل النمو الخلوية المناسبة مما يعطي نسيجاً اصطناعياً يمكن غرسه عند المريض. تتطلب تغذية الخلايا الداخلية التي نمت على هذه السقالات تشكيل أوعية شعرية (capillary vessels) (المسماة بالـ angiogenesis) ـ وهي عملية غير مضبوطة بشكل كاف حالياً. لذلك تم استخدام طرائق تعتمد على التصميم بمساعدة الحاسب (CAD) والتصنيع بمساعدة الحاسب (CAM) لتصنيع أشكال سقالات معقدة اعتباطية من نماذج مصممة بمساعدة الحاسب (تصنيع بدون شكل صلب أو ثابت (solid freeform fabrication (SFF)).

مزارع خلوية ثلاثية الأبعاد (3D cell cultures). يمكن لأنواع مختلفة من الخلايا السلفية (progenitor cells) والأولية (primary cells) أن تزرع تشاركياً (co-cultured)، لتشكل نسيجاً معادلاً أكثر تعقيداً. فعلى سبيل المثال، تم إنتاج بشرة اصطناعية من خلال تنمية (توسع) خلايا ظهارية (epithelial cells) بوجود خلايا قرتينية (keratinocytes). كما تم الحصول على جلد ثلاثي الأبعاد معادل بزرع تشاركي لأرومة ليفية (fibroblast) جلدية، متضمَّنة في قالب كولاجين مع خلايا قرتينية لتشكيل بشرة متقرنة (cornified epidermis).

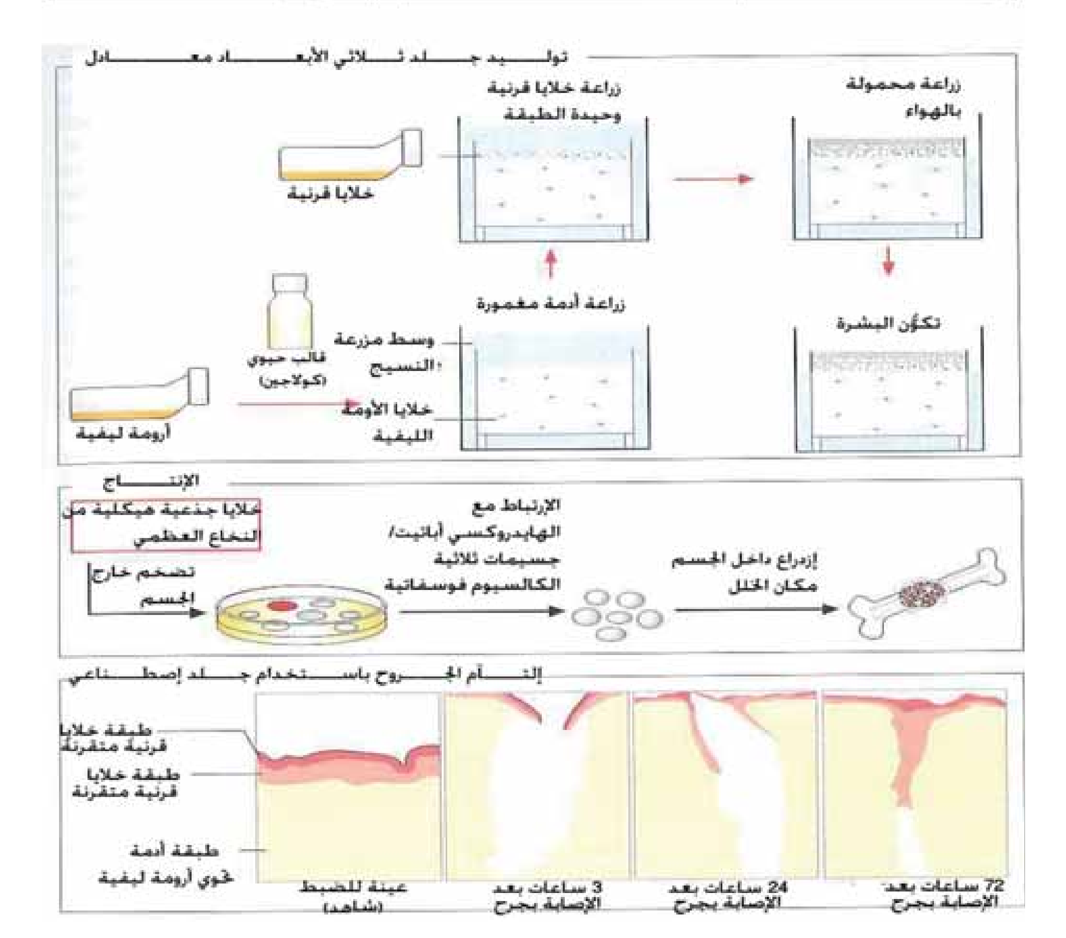
الخلايا الجذعية (Stem cells). تملك الخلايا الجذعية الجنينية ذات القدرات الوافرة (pluripotent) لدى الإنسان إمكانيات أساسية في هندسة النسيج، حيث يمكنها أن تتطور إلى مدى واسع من أنواع خلوية مختلفة، تبعاً لمحيطها ولعوامل النمو الخلوي الموجودة. يعتبر النخاع العظمي لدى البالغ مصدراً تقليدياً للخلايا الجذعية مع القليل من التحفظات الأخلاقية. كما يمكن أيضاً جمع الخلايا الجذعية من دم الحبل السري للمواليد الجدد.

التطبيقات (Applications). تستخدم هندسة النسيج غالباً في 1) تحضير نظم اختبار تقوم على زراعة خلايا بشرية، في مجال الصناعات الدوائية والتجميلية؛ وبالتالي، لاختبار إمكانية حدوث تهيجات بسبب بعض المركبات، أو لتطوير الدواء، والجلد الثلاثي الأبعاد والقرنيات، وذلك باستخدام خلايا من أصل بشري كبديل عن الاختبارات الحيوانية وهو ما أعطى نتائج أكثر وثوقاً، و2) الازدراع (الزرع). فقد أصبح الجلد البشري الاصطناعي متاحاً تجارياً منذ فترة؛ مثل الديرماغرافت ® (Dermagraft®)، وهو نسيج جلدي بشري مهندس مركب من سقالة (scaffold) قابلة للامتصاص حيوياً (bioabsorbable) وأرومات ليفية (fibroblasts) بشرية. كما يستخدم في علاج الحروق ودعم التئام الجروح في أنواع مختلفة من التقرحات (تقرحات القدم بسبب السكري، التقرحات الوريدية وتقرحات الضغط) وذلك بخفض إمكانية حدوث الإصابات إلى الحد الأدنى، وباستبقاء السوائل إلى أن يصبح جلد المريض نفسه متاحاً بكمية كافية للتطعيم الذاتي (autograft). من ناحية أخرى، تم تحريض خلايا جذعية لُحمية متوسطية (mesenchymal) مقيمة في النخاع العظمي لدى البالغ لتتمايز إلى خلايا غضروفية (chondrocytes) بواسطة عوامل نمو خلوي، وإعطاء نسيج غضروفي. يتم علاج الخلل في الغضاريف الناتج من الصدمات بالتطعيم الذاتي للغضروف (autologous cartilage transplantation (ACT))، وهي طريقة يتم فيها حقن خلايا غضروفية في المنطقة المصابة المخاطة حديثاً بسديلة سمحاقية (periost flap). في الختام، تم تطوير طعوم عصبية اصطناعية أو قنوات توجيه للأعصاب وذلك من أجل تجديد الأعصاب.

المستهدفات في هندسة الأنسجة			
هندسة الأنسجة التي تقوم على الخلايا الجذعية		هندسة الأنسجة التي لا تقوم على الخلايا الجذعية	
الأوعية الدموية	الكبد	المثانة	الغضروف المفصلي
العظم	البنكرياس	الغضاريف (أذن، أنف مفاصل)*	الغشاء المخاطي الفموي
الغضاريف	النسيج العصبي	صمامات القلب	الغدد اللعابية
القرنية	العضلات الهيكلية	الأمعاء	القصبة الهوائية
عاج الأسنان	الجلد	الكلية	الحالب
عضلة القلب			القناة البولية

* قيد الاختبار سريرياً

بعض شركات هندسة الأنسجة		
الولايات المتحدة الأمريكية	Advanced Tissue Sciences	أنسجة وأعضاء بشرية، مثلاً، الجلد والغضاريف والعظام والكبد
الولايات المتحدة الأمريكية	Curis	إلتآم الجروح، الطب التجددي
الولايات المتحدة الأمريكية	MatTek	نظم اختبار الجلد
ألمانيا	BioTissue Technologies	جلد، غضاريف
هولندا	IsoTis	جلد، غضاريف، عظام
فرنسا	SkinEthic Laboratories	نظم اختبار الجلد



• الإنترفيرونات (Interferons)

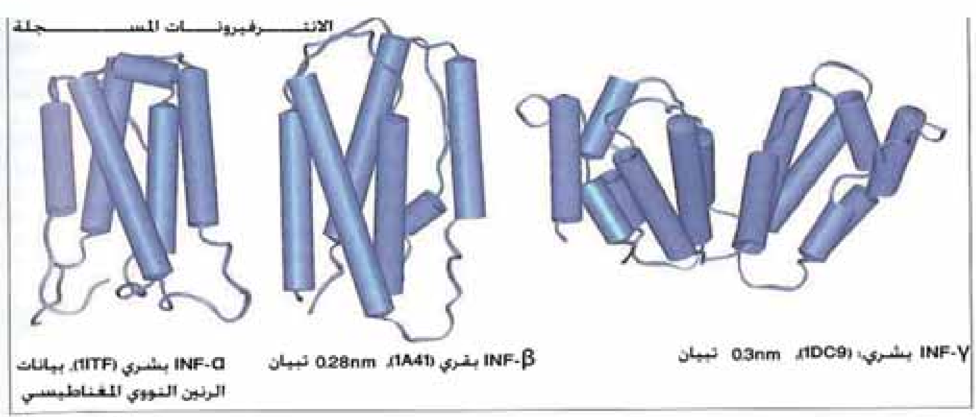
عمـوميـات (General). الإنـتـرفـيـرونـات (interferons (INF)) هي عبارة عن بروتينات تنتجها خلايا الجهاز المناعي المتنوعة. وهي تعمل كرُسُل محرِّضة للاستجابة المناعية عند ارتباطها بمستقبلاتها (receptors). تصنِّع الحيوانات العليا عدة أنواع من الإنترفيرون: يرمز إليها بـ INF-α، INF-β، INF-γ وINF-ω، التي تساهم في تنظيم عمل حوالى 20 ـ 30 جيناً، كما تُبدي طيفاً واسعاً من الخصائص المنظمة للمناعة، والمضادة للفيروسات والمضادة للتكاثر. يكون كل من INF-α وINF-β ثابتين على درجة 5 من الرقم الهيدروجيني، وهما يرتبطان بنفس المستقبل (النوع I-INF)، في حين يتعطل INF-γ بالحموضة ويرتبط بمستقبلات من النوع II-INF.

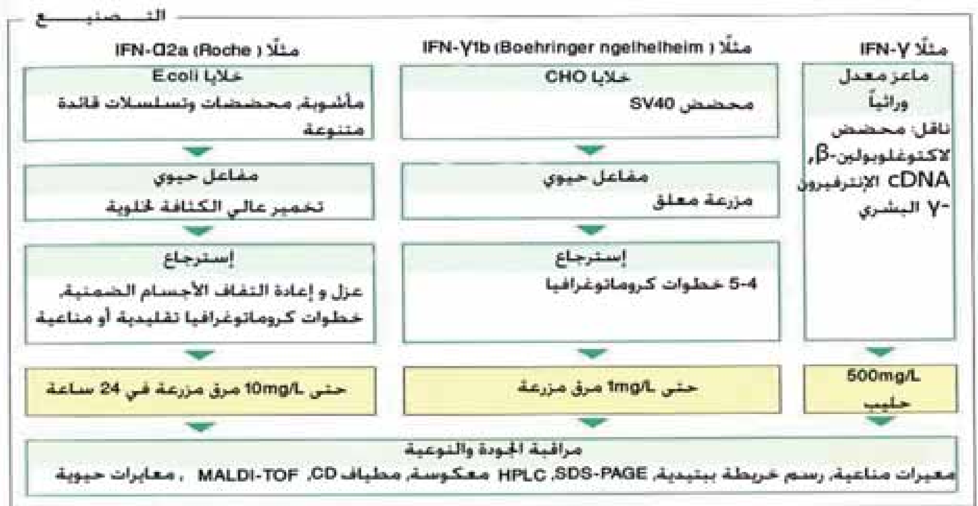
الخصائص والتطبيقات (Proporties and application). تصنع خلايا الدم البيضاء الإنترفيرون ألفا (INF-α) كعائلة مؤلفة من أكثر من 20 جيناً غير أليلي (nonallelic) تُظهر تشابهاً كبيراً بالتسلسل. تتكون تسلسلاتها البروتينية من 165 ـ 166 حمضاً أمينياً مع وزن جزيئي بحدود 16kDa، التي يمكن أن تصل بإضافة مجموعة الغلايكوزيل (glycosilation) إلى 26kDa. تتمثل التطبيقات السريرية الأكثر أهمية للإنترفيرون ألفا حتى الآن بعلاج التهاب الكبد B وC وسرطانات مثل أورام المثانة، الميلانوم (melanoma)، اللوكيميا (leukemia) والورم الليمفي (lymphoma). وتبلغ قيمته العالمية في السوق حوالى 1.4 بليون دولار أمريكي في العام. يُصنَّع الإنترفيرون بيتا (INF-β) في الأرومات الليفية (fibroblast) ويتكون تسلسله البروتيني من 166 حمضاً أمينياً؛ لكن بسبب إضافة الغلايكوزيل يصبح وزنه الجزيئي حوالى 20kDa. ويتمثل استخدامه السريري الأكبر في علاج تصلب الأنسجة المتعدد مع قيمة في السوق تقدر بحوالى 1 بليون دولار أمريكي في العام. وبالنسبة إلى الإنترفيرون غاما (INF-γ)، الذي يسمى أحياناً «الإنترفيرون المناعي»، يتشكل في اللمفاويات التائية (T lymphocytes) وهو ينشط الليمفاويات. يتألَّف تسلسله الببتيدي من 143 حمضاً أمينياً، كما يمكن أن يضاف إليه الغلايكوزيل باستطالات مختلفة ما يؤدي إلى أوزان جزيئية له تتراوح بين 15 و25kDa. فالإنترفيرون غاما 1 ب (1bγINF-b) مسجل لعلاج الوُرام الحبيبي المزمن (chronic granulomatosis) وترقق العظام، حيث تبلغ قيمته في السوق العالمي حوالى 200 مليون دولار أمريكي. أما الاستخدامات العلاجية الأخرى للإنترفيرونات فتكمن في مراحل مختلفة من الاختبارات السريرية، مثل علاج عدة سرطانات (INF-α وINF-β)، وعلاج أمراض المناعة الذاتية (autoimmune deseases) والإصابات الفيروسية (INF-α، INF-β وINF-ω)، وكذلك علاج التهاب المفاصل الريثاني (rheumatoid arthritis)، وتليف الرئة الذاتي (idiopathic pulmonary fibrosis) والربو INF-γ).

الاستنساخ (الكلونة) والتعبير (Cloning and expression). بالرغم من أنه تم التعرف بسرعة على الإمكانيات العلاجية للإنترفيرونات (interferons)، إلا أن تحضيرها التقليدي بتجزئة (fractionation) دم المتبرِّع حالَ دون القيام بدراسات سريرية (clinical studies) واسعة النطاق. لقد أدى فقط ظهور الهندسة الوراثية منذ عام 1986 إلى إنتاج الإنترفيرونات النقية صناعياً كمستحضرات سريرية. في حين، بدأ استنساخ هذه البروتينات المتشكلة بكميات قليلة جداً منذ عام 1982، حيث نجح أولاً استنساخ الـ INF-α بالطرق التالية: 1) عزل الـ RNA الرسول (mRNA) لخلية بيضاء ونسخه عكسياً (reverse transcription) إلى DNA متمم (cDNA)، 2) التعبير في الـ *E.coli* والتهجين (hybridization) مع الـ RNA الرسول الذي يُشفر للـ INF-α، 3) ترجمة الـ RNA الرسول المهجن بالتصنيع البروتيني من دون خلايا واختبار الخصائص المضادة للفيروس لدى البروتين المنتج. وبما أن الشكل المضاف إليه مجموعة الغلايكوزيل من الإنترفيرونات المأشوبة (recombinant) لا يبدي تأثراً كبيراً في صعيد الفعالية الطبية، فقد استخدمت غالباً الـ *E.coli* ككائن حي مضيف. ومع ذلك، يتم التعبير عنها أيضاً في خلايا مضيفة أخرى مثل الـ *Saccharomices cerevicia* و*Pichia pastoris* وخلايا ثديية.

التصنيع والاسترجاع (Manufacture and recovery). بدأ حوالى عام 1978 الإنتاج الصناعي للـ INF-α بالاعتماد على خطوط خلايا بشرية من الورم الأرومي اللمفاوي (lymphoblastoma) المصابة بالفيروس سينداي (Sendai) أو ما يعرف بخلايا ناوالما (*Nawalma cells*). إلا أن هذه الطريقة أدت إلى تشكيل ثمانية أشكال متناظرة (isoforms) على الأقل من INF-α. أما اليوم، فتنتَج الإنترفيرونات باستخدام خلايا الـ *E.coli* أو خلايا CHO (خلايا مبيض الهامستر الصيني) المأشوبة (recombinant) إذا كانت إضافة مجموعة الغلايكوزيل ضرورية كما في حالة INF-ω. عند استخدام الـ *E.coli*، يمكن الحصول على عطاءات مرتفعة من الأجسام الضمنية (inclusion bodies) في عمليات التخمير ذات الكثافة الخلوية العالية. لكن الخطوة المُحدِّدة للكلفة تكمن في المعالجة التالية التي تتضمن إعادة انثناء (التفاف) الأجسام الضمنية والكروماتوغرافيا (chromatography). على سبيل المثال، تحضر شركة روش (Roche) الإنترفيرون ألفا 2 أ (INF-α2a) أو روفيرون أ ® (Roferon A®) باستخدام خلايا *E.coli K12* المأشوبة؛ حيث إنه بعد حصد الخلايا يتم تحطيمها بالتجميد العميق مما يجعل الكتل الخلوية الحاوية على الأجسام الضمنية المأشوبة ثابتة لكي تُخزَّن. وبعد التحريك ضمن الدارئ (buffer)، تزال الأشلاء الخلوية بالطرد المركزي وينقى المزيج البروتيني بمراحل كروماتوغرافية مختلفة. لتخضع المنتجات في النهاية لاختبارات ضبط الجودة الدقيقة والمكلفة، المتعلقة بشكلٍ خاص بالانثناء الصحيح.

	المؤشرات	المصنّع
الانترفيرونات المسجلة		
INF−α2a	التهاب الكبد B و C	Roche
INF−α2a المرتبط بعديد الإيثيلين غلايكول: α2a−PEG-INF	مضاد فيروسي ومضاد سرطان	Roche
INF−α2b	لوكيميا، الورم النخاعي، الميلانوم، التهاب الكبد B و C	Biogen ،Schering-Plough ، Yamanoouchi ،Enzon
INF−β1a	التصلب المتعدد	Serono
INF−β1b	التصلب المتعدد	Chiron ،Schering AG
INF−γ1a	التهاب المفاصل الرثياني	Rentschler
INF−γ1b	الورام الحبيبي المزمن	Genentech، Boehringer-Ingelheim
الإنترفيرون الإجماعي	التهاب الكبد C	Amgen
INF−ω	التهاب الكبد، الدفاع الفيروسي	Boehringer-Ingelheim





• الإنترلوكينات (Interleukins)

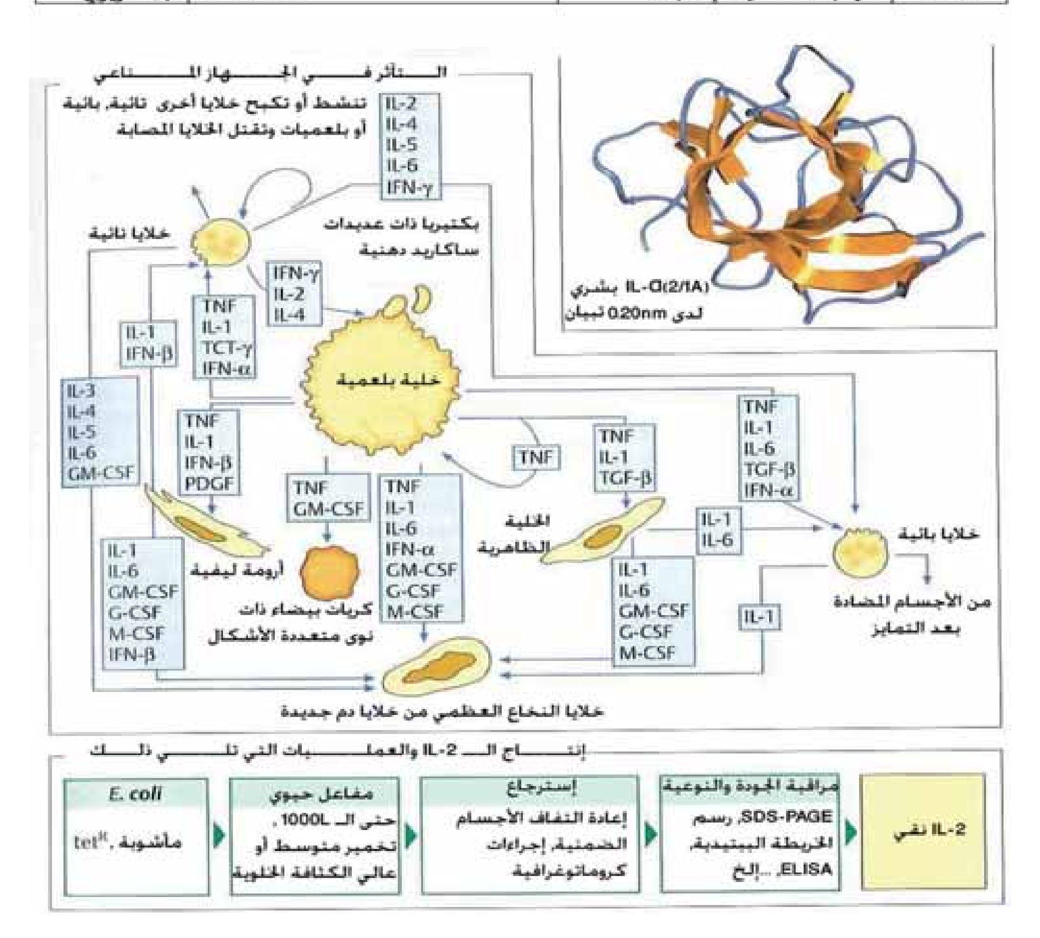
عموميات (General). الإنترلوكينات (interleukins (IL)) هي بروتينات تُشكَل في أنواع مختلفة من خلايا الجهاز المناعي. وهي غالباً ما تسمى بـ «هرمونات الجهاز المناعي» حيث إنها تعدل فعالية خلايا أخرى في هذا الجهاز من خلال الارتباط بمستقبلات محددة. لقد تم اكتشاف أكثر من 20 نوعاً من الإنترلوكينات عند الإنسان (IL-1 ـ IL-23). كما تم تسجيل الـ IL-2 للاستخدام العلاجي؛ أما الإنترلوكينات الأخرى فهي قيد الاختبارات السريرية.

الخصائص والتطبيقات (Proporties and applications). الإنترلوكين ـ 1 (IL-1)؛ ويُصنَّع بشكلين (IL-1β وIL-1α) من قبل خلايا البلعمة (phagocytes) (الخلايا البلعمية (macrophages)، الخلايا الوحيدة (monocytes)). يتكوَّن على هيئة ما قبل بروتين (بروتين أولي (preprotein)) ذي وزن جزيئي قدره 31kDa، لتتم معالجته لاحقاً بالتحلل البروتيني (proteolytically) إلى بروتين فعال بيولوجيا ذي وزن جزيئي يبلغ 17.5kDa. يبدي هذا الإنترلوكين فعالية داعمة للالتهاب (proinflammatory activity) كما ينشط نمو اللمفاويات، والأرومات الليفية (fibroblasts)، والخلايا المشكِّلة للدم (hematopoetic cells) والخلايا التوتية (thymocytes). لقد تم تحديد مستقبلات الـ IL-1 على سطوح الخلايا التائية (T-cells)، والأرومات الليفية (النوع I)، واللمفاويات البائية (النوع II). ومن المعتقد أن الخلايا البلعمية تفرز الـ IL-1 إثر قيامها ببلعمة المستضد (antigen) وتحليله، وبذلك تزيد من تشكل («تضخم» (expansion)) خلايا الدفاع المناعي ضد هذا النوع من المستضد. الإنترلوكين ـ 2 (IL-2)، وهو يلعب (عامل نمو الخلايا التائية) دوراً هاماً أثناء تضخيم الدفاع المناعي اللاحق. يتشكل هذا الإنترلوكين، الأكثر دراسة، من قبل الخلايا التائية المفعَّلة بالمستضد وهو ينشط نمو وتمايز (differentiation) اللمفاويات التائية والبائية. كما تتعزز سلسلة الدفاعات المناعية (immune cascades) أكثر بوجود مستقبلات IL-2 على سطح الخلايا التائية، وكذلك على سطح الخلايا القاتلة الطبيعية (NK-cells) والخلايا الوحيدة (monocytes) التي تمتلك كل منها مستقبلات IL-2 كمكوِّن أساسي (constitutively). لقد تم التعرف على البنية البلورية (crystal structure) لهذا البروتين السكري (glycoprotein) المحب للماء (hydrophilic)، المكوَّن من 133 حمضاً أمينياً (ذو وزن جزيئي يبلغ 15.5kDa) وهو مسجل كدواء لعلاج سرطان الكلية. الإنترلوكين ـ 3 (IL-3)؛ وهو عبارة عن بروتين سكري مكون من 133 حمضاً أمينياً. يتم تصنيعه من قبل اللمفاويات التائية، ويحرِّض تمايز الخلايا الجذعية في النخاع العظمي إلى خلايا بيضاء ناضجة. وبما أنه يتدخل أيضاً في تمايز أنواع خلايا أخرى في الجهاز المناعي، فإنه يسمّى في أغلب الأحيان بـ «عامل نمو متعدد القدرات» (multipotent growth factor). الإنترلوكين ـ 4 (IL-4)؛ وهو بروتين سكري ذو وزن جزيئي قدره 20kDa، لا ينشط تشكل اللمفاويات البائية والتائية فحسب، مثل IL-1، إنما ينشط أيضاً إفراز الغلوبولينات المناعية G وE (IgG وIgE). إضافة إلى ذلك، فهو يعزز عرض المستضدات من قبل الخلايا الوحيدة. الإنترلوكين ـ 6 (IL-6)؛ ويمتلك خصائص مشابهة للـ IL-1 وIL-2، لكنه خلافاً عنهما، فإنه يحرض التعبير عن عدة بروتينات من بروتينات الطور الحاد (acute-phase proteins) في خلايا الكبد؛ ويعتقد أنه يلعب دوراً في أمراض مناعة ذاتية (autoimmune diseases) عدة. الإنترلوكين ـ 10 (IL-10)؛ وهو يلعب دوراً تثبيطياً (inhibition) في التصنيع الحيوي لإنترلوكينات أخرى («عامل مثبط لتصنيع السايتوكين (cytokine)»). بالإضافة إلى الإنترلوكين ـ 12 (IL-12)، الذي ينشط تصنيع الإنترفيرون غاما (δ-interferon) في اللمفاويات التائية والخلايا القاتلة الطبيعية، ويبدو أنه يلعب دوراً محورياً في قيادة الدفاع المناعي. إن القسم الرئيسي من الدراسات السريرية المعتمدة على الإنترلوكينات المأشوبة (recombinant) تخصّ علاج السرطان. كما تُشاهَد إمكانيات تطبيقية إضافية في حالات التئام الجروح وتحسين الدفاع المناعي عند مرضى متلازمة العوز المناعي المكتسب (AIDS) والمرضى المكبوحي المناعة (immunosuppressed) بعد عملية ازدراع (زرع) النخاع العظمي. لقد تم حل البنية البلورية للـ IL-19 و IL-22، حيث تبين وجود اختلاف كبير بين البنيتين وبنية IL-2.

تصنيع الـ IL-2. المضاف إليه مجموعة الغلايكوزيل (glycisylated) من هذا الإنترلوكين لا يبدو حاسماً في العلاج، فقد تم إنتاج البروتين في خلايا الـ *E.coli* المحولة (transformed)؛ حيث تم الحصول على تراكيز عالية من الأجسام الضمنية (inclusion bidies) باستخدام عمليات تخمير ذات كثافة خلوية متوسط أو مرتفعة. تجري تنقية منتجات الإنترلوكين هذه أولاً بكروماتوغرافيا تعتمد على نفاذية الهلام (gel permeation chromatography)، بعد ذلك تُذوَّب في ظروف اختزالية (reducing)، ليتبعها إعادة انثناء (refolding) بوجود المؤكسدات (oxidants). كما وتُنفَّذ تفاعلات الترسيب، وكروماتوغرافيا السائلة ذات الضغط العالي (HPLC) والترشيح الهلامي (gel filtration) لتحقيق مزيد من التنقية. تُحدَّد عادة فعالية الـ IL-2 بمعايرة حيوية معقدة (complex bioassay) تُنفَّذ على الفئران بإدخال الثايميدين (thymidine) الموسوم بالتريسيوم (H^3) في الخلايا التائية (T-cells) المعتمدة على الـ IL-2.

الانترلوكينات (عام 2000)

	الدراسات السريرية	المصنّع	الوضع
IL-1	تكون الدم	Roche/Immunex	قبل السريري
IL-1R	الربو	Immunex	الطور I
IL-1RA	الالتهابات	Amgen	الطور II
IL-2PEG	فيروس نقص المناعة المكتسب (HIV)	Chiron	الطور III
IL-2	سرطان الكلية	Chiron	مسجل
IL-3	ازدراع الخلايا الجذعية	Sandoz	الطور III
IL-4	سرطان الرئة	Schering-Plough	الطور II
IL-6	نقص الصفيحات	Serono	الطور I/II
IL-8RA	الالتهابات	Repligen	قبل السريري
IL-10	أورام سرطانية، أمراض المناعة الذاتية	Schering-Plough	سريري
IL-11	نقص الصفيحات	Genetics Institutes, Schering-Plough	الطور III
IL-12	فيروس نقص المناعة المكتسب، أورام سرطانية	Genetics Institutes ،Wyeth-Ayerst	الطور I/II
IL-15	التهاب المخاطية، إصابات	Immunex	قبل سريري



• الإيريثروبويتين وعوامل نمو أخرى

(Erythropoietin and other growth factors)

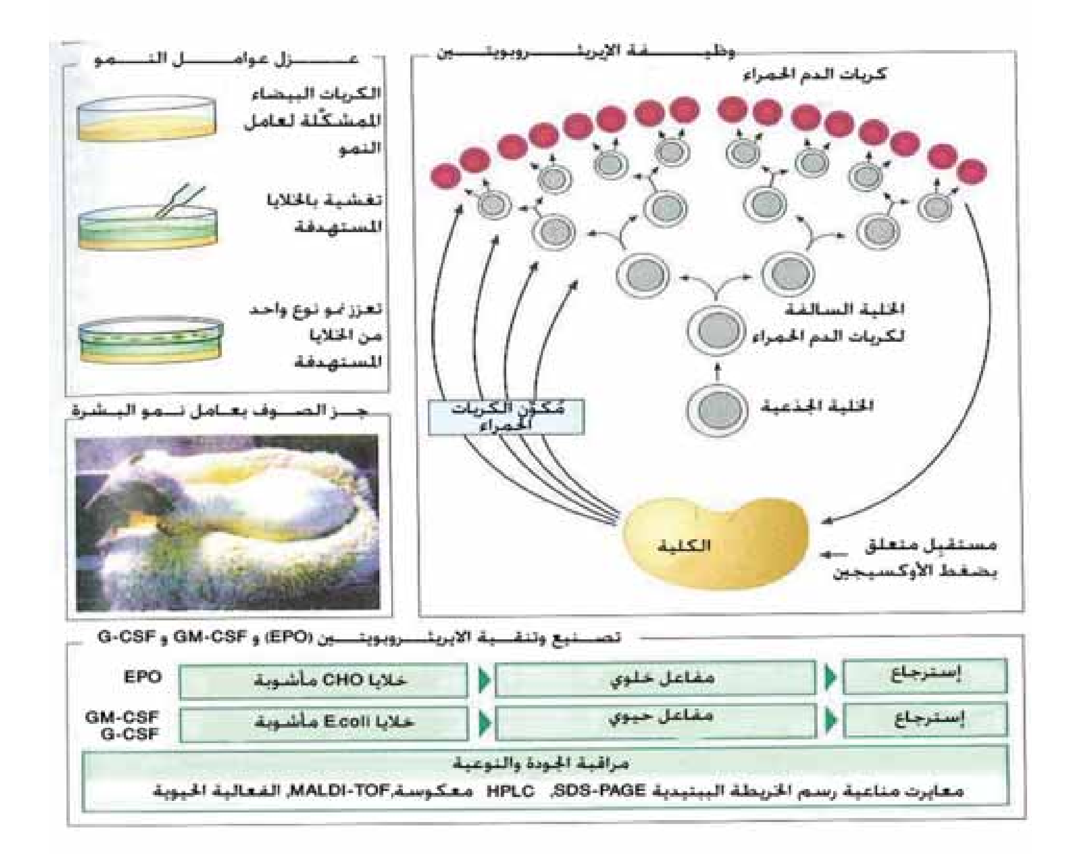
عموميات (General). لقد تم العثور أثناء تطوير زراعة الأنسجة الحيوانية، على عوامل مختلفة تنشّط نمو نوع محدد من الخلايا (العامل المحفز لتشكل المستعمرة (colony-stimulating factor (CSF)). وهي تُشَكَّل عادة بكميات دقيقة، وتعمل بالارتباط بمستقبلات سطحية للخلايا المستهدفة، حيث إنها تنتمي إلى مجموعة السايتوكين (cytokine). لم يكن بالإمكان تحضير هذه العوامل بكميات كبيرة لدراسة تركيبها واسكتشاف إمكانياتها العلاجية في تعزيز نمو أنواع خلايا محددة (نوعية) مثل خلايا الجلد، أو الأعصاب، أو الدم أو العظام، إلا بعد نشوء تقانات الهندسة الوراثية. وقد اكتُشِف خلال هذه الدراسات المبكرة إمكانية الاستخدام العلاجي الهام لكل من الإيريثروبويتين ((erythropoietin (EPO))، والعامل المحفز لتشكل مستعمرات الخلايا المحببة أو المحببات (G-CSF) (granulocytes) والعامل المحفز لتشكل مستعمرات المحببات والبلعميات (GM-CSF) (macrophages): فال EPO يثير تشكل الخلايا الحمراء، وال G-CSF يثير تشكل المحببات العدلة (neutrophilic granulocytes) والـ GM-CS يثير تشكل المحببات الأيوسينية أو الحَمضية والعَدِلة. يمكن استخدام هذه البروتينات بنجاح في أنواع مختلفة من فقر الدم، خاصة في حالة مرضى الغسيل الكلوي. في ألمانيا وحدها، يقدر عدد مرضى فقر الدم الكلوي (الغسيل الكلوي) الذين يتلقون الإيريثروبويتين بحوالى 60000، ومرضى قلّة العَدِلات المتلقين لـ GM-CSF أكثر من 300000 (في حالة قلة العَدِلات: تتناقص العَدِلات في الدم، مثلاً، بعد العلاج الكيميائي والغسيل الكلوي؛ وبالنتيجة يزداد خطر الإصابة). يبلغ السوق الدولي لهذين المركبين حوالى 6 بليون دولار أمريكي في العام.

الإيريثروبويتين (Erythropoietin). وهو عامل ينشط نمو الخلايا الحمراء. يصنَع في الخلايا البطانية (endothelial cells) في الكلية وفي خلايا كوبفير (Kuppfer) في الكبد، كما يُنظِّم بالضغط الجزئي للأكسيجين في الدم. في الخلايا الجذعية المشكلة للدم (hematopoietic stem cells) الموجودة في النخاع العظمي، يثير الإيريثروبويتين فقدان النوى والتشكل المرافق للهيموغلوبين (hemoglobin)، مؤدياً لتشكل الخلايا الحمراء. وبالتالي، فإن الإيريثروبويتين هو عامل علاجي قيم في حالات فقر الدم، وخاصة فقر الدم الثانوي الذي هو أحد أهم نتائج غسيل الكلى (dialysis) عند المرضى المعتمدين على كلية اصطناعية. كما أنه عندما تم دمجه مع عوامل نمو أخرى في النخاع العظمي مثل العوامل المحفزة لتشكل المحببات (GM-CSF) أو المحببات والبلعميات (G-CSF)، التي تنشط نمو المحببات (granulocytes) والحمضات (eosinophils) والخلايا الوحيدة (monocytes)، أصبح الإيريثروبويتين دواءاً مجدداً لاغنى عنه لدى مرضى الغسيل الكلوي. لقد تمّت كلونة الجين المشفّر له عام 1984 من النخاع العظمي البشري أولاً. وهو بروتين سكري يتألف من سلسلة ببتيدية منفردة مكونة من 165 حمضاً أمينياً فقط؛ مع أربع سلاسل سكر كبيرة، مرتبطة بثلاث ثمالات أسبارجين (aspargine residues) وثمالة ثريونين (threonine). تمثل سلاسل السكريات هذه حوالى 40٪ من الكتلة المولية للبروتين ذات الوزن الجزيئي 34kDa، وهي ضرورية لوظيفة البروتين. إلا أنه بسبب مرونتها، فإن كافة محاولات بلورة (crystallize) بروتين الإيريثروبويتين الفعال باءت بالفشل، في حين أن المفاهيم البنيوية المتاحة مبنية على معطيات الرنين النووي المغناطيسي (NMR). ونظراً إلى الحاجة إلى الحفاظ على شكل إضافة مجموعة الغلايكوزيل (glycosylation) الخاصة جداً (highly specific glycosylation) في نظام المضيف الاصطناعي، فإن زراعة الخلايا الثديية هي حالياً الطريقة الوحيدة لتصنيع الإيريثروبويتين تجارياً، باستخدام خلايا مبيض الهامستر الصيني (CHO) في أغلب الأحيان.

عوامل النمو (Growth factors). على نحوٍ مشابه بالإيريثروبويتين (EPO)، تنشِّط بروتينات سكرية أخرى نمو وتمايز أنواع مختلفة من الخلايا، مثلاً، خلايا الأعصاب، والجلد، والعظام، وعضلة القلب والدم. وقد تمّت كلونة (cloning) وتحضير مدى واسع من عوامل النمو بكميات كافية للاختبارات السريرية (clinical tests)، كما أن عدة عوامل منها تم تسجيلها كأدوية، أو هي الآن في مرحلة متقدمة من الاختبار السريري، مثلاً، لعلاج مختلف الأمراض العصبية، والتقرحات الهضمية وهشاشة العظام. فعلى سبيل المثال، تمت دراسة عامل النمو الظهاري (epithelial grouth factor (eGF)) عند البشر لعلاج إعتام عدسة العين ـ الساد ـ (cataract)، وعند النعاج لـ «جز الصوف بيولوجياً»، بالرغم من عدم وجود ميزات اقتصادية لهذه الطريقة.

التصنيع. يُنتج الإيريثروبويتين (EPO) في زجاجات جهاز الدحرجة (roller bottles) أو في مفاعلات حيوية (bioreactors) بسعة 1000L أو أكثر، وذلك باستخدام خلايا ثديية مأشوبة (recombinant)؛ بحيث تعتبر خلايا مبيض الهامستر الصيني (CHO) الخطوط الخلوية المفضلة. تستغرق عملية التخمير 30 يوماً، يُفرز فيها الإيريثروبويتين إلى الوسط المغذي، ليُنقّى بعدها من مرق الزرعة بسلسلة من خطوات الكروماتوغرافيا (chromatography). ونظراً إلى أن الشكل الأصلي لإضافة الغلايكوزيل (glycosylation) ذي الأهمية المفتاحية لفعالية الإيريثروبويتين، فإنه يتم اختبار المنتج المأشوب النقي بشكلٍ كامل بالطرائق المناسبة. أما بالنسبة إلى العديد من عوامل النمو الأخرى (مثل GM-CSF وG-CSF)، فإن لشكل إضافة الغلايكوزيل أهمية أقل، أو حتى غير موجودة على صعيد الفعالية الدوائية، لذا يمكن استخدام كائنات مجهرية مأشوبة مثل الـ *E.coli* في عملية إنتاجها.

عوامل النمو				
	نوع البروتين	الشركة	التطبيقات	الوضع
الإيريثروبويتين	بروتين سكري ، 34kDa	Amgen ،Roche ، Boehringer-Ingelheim	فقر الدم بعد غسيل الكلى والعلاج الكيميائي	متوفر في السوق
عامل تنشيط مستعمرة الخلايا المحببة (G-CSF)	بروتين سكري ، ~20kDa	Amgen	أمراض العدوى	متوفر في السوق
عامل تنشيط مستعمرة المحببات والبلعميات (GM-CSF)	بروتين سكري، -18~ 30kDa	Wyeth ،Schering-Plough	أمراض العدوى، ... الخ	متوفر في السوق
عامل تنشيط مستعمرة البلعميات	بروتين سكري ثنائي الأجزاء، 90kDa	Immunex	اللوكيميا الحادة، السرطان، الأمراض الفطرية	
عامل نمو الخلايا القرنية		Amgen	التهاب الأغشية المخاطية	الطور III
عامل نمو الأعصاب		Genentech، Amgen	اعتلالات عصبية محيطية	الطور II/III
عامل نمو البشرة		Johnson & Johnson	التأم الجروح، الساد	الطور II
عامل نمو الأرومة الليفية		Scios Nova	القرحة الجلدية	تم إطلاقه
بروتين مشكل شكل العظام		Genetics Institutes	أمراض العظام والغضاريف، اعتراس نقي العظام	الطور I
مكون الصفيحات		Genentech	نقص الصفيحات	الطور III
CSF=colony stimulating factor GF=growth factor				



• بروتينات علاجية أخرى

(Other therapeutic proteins)

عموميات (General). من بين مئات البروتينات المأشوبة التي هي قيد الدراسة من أجل التطبيقات العلاجية، نناقش في هذا الفصل سايتوكين عامل تنكرز (نخر) الورم (cytokine tumor necrosis factor (TNF))، والـــ DNase I والغلوكوسيريبروزيداز (glucocerebrosidase).

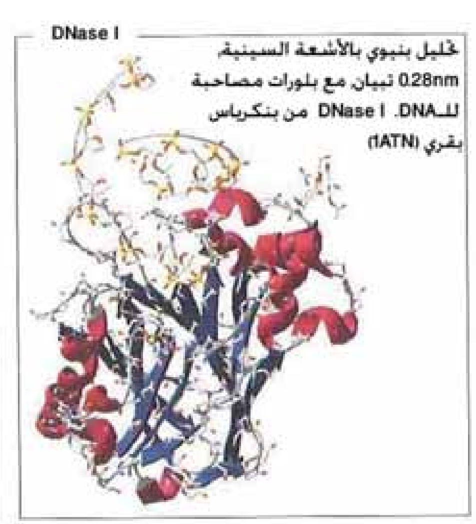
عامل تنكرز (نخر) الورم (Tumor necrosis factor (TNF)). يعود اكتشاف الـ TNF إلى ملاحظات مبكرة حول تباطؤ تطور بعض الأورام إثر تعرض المريض لإصابة بكتيرية. وبذلك، منذ ذلك الوقت، تبين أن السموم الداخلية (endotoxins) البكتيرية تنشط تشكل هذا العامل (TNF) داخل الخلايا البلعمية (macrophages)، والوحيدة (monocytes) والقاتلة الطبيعية (Natural killer cells (NK)) المفعَّلة، وكذلك داخل خلايا الكبد والدماغ. يَظهر الـ TNF بشكلين ذوات فعالية بيولوجية متشابهة، بالرغم من وجود أقل من 30٪ تشابه في تسلسلهما. يُنتَج الـ TNFل (ذو وزن جزيئي يبلغ 17.3kDa، ومؤلف من 157 حمض أميني) من قبل الخلايا البلعمية، ويسيطر على بنيته البلورية (crystal structure) عدد غير عادي من صفائح بيتا (sheets). كما تم العثور على نوعين من مستقبلات TNFα في أنواع خلايا مختلفة. أما الـ TNFβ (وهو بروتين سكري (glycoprotein) مكوَّن من 171 حمض أميني) فيُنتَج من قبل الخلايا اللمفية («اللمفية السّامّة» («lymphotoxins»)) ويرتبط بنفس المستقبلات، لكن وظيفته غير مفهومة بعد بشكلٍ جيد. لقد تركز الاهتمام من الأصل بالـ TNFα لدى ملاحظة تأثيره السُّمي (cytotoxic) على الخلايا المحوّلة (transformed) المعزولة التي يمكن تنشيطها لاحقاً بالإنترفيرونات (interferons). إلا أن الدراسات السريرية لم تتوافق مع هذه المعطيات، بل على العكس أظهرت آثاراً جانبية عالية السمّيّة. في الواقع، يبدو أن العديد من الآثار الجانبية غير المرغوبة للسيتوكينات (cytokines) (الالتهاب، التهاب المفاصل، ارتفاع ضغط الدم، . . . الخ) ناجمة عن تشكل TNFα. كما أن TNF ينخرط أيضاً في تفاعلات مثل الصدمة الإنتانية (septic shock) (التي تثار أيضاً بعديدات السكاريد الدهنية (lipopolysaccharides))، والحالات الدَنَفية (cachectic) (الهزال) التي تلي الإصابات المزمنة، وتطور الورم. كذلك، ينظم هذا العامل تطور سايتوكينات أخرى، وينخرط في تطور أمراض المناعة الذاتية (autoimmune deseases) مثل التهاب المفاصل الريثاني (rheumatoid arthritis) ويلعب دوراً في رفض الإزدراع (الزرع). هذا الدور المتناقض والمثير للـ TNF وإنتاجه السهل في الكائنات المضيفة المأشوبة (مثلاً، الـ *E.coli*) أدى لاهتمام خاص بهذه البروتينات وأنواعها في الدراسات السريرية.

الـ DNase I (البولموزايم ®) (Pulmpzyme®). التليف المثاني (cystic fibrosis (CF)) هو مرض وراثي مصاب به حوالى 30000 طفل وبالغ في الولايات المتحدة الأمريكية وحدها. كما أن واحد من كل 28 قوقازياً هو حامل للجين المسؤول عن هذا المرض، من دون ظهور أعراض، ومن دون أن يدري. هذا المرض يجعل الجسم ينتج مخاطاً سميكاً ولاصقاً بشكل غير طبيعي، وذلك بسبب نقل خاطئ للصوديوم والكلور من داخل الخلايا المبطنة للأعضاء، مثل الرئة والبنكرياس، إلى سطحها الخارجي. وبالتالي، فإن هذا المخاط يسد البنكرياس مانعاً الأنزيمات من الوصول إلى الأمعاء، كما يؤدي إلى إعاقة مفاجئة للتنفس. وكذلك أيضاً، تزداد لزوجة النخامة (sputum) أكثر بسبب الـ DNA الخارج خلوي الناجم عن الكريات البيضاء. لذلك، تتم معالجة المصاب بالتليف المثاني باستنشاق بخاخ يحتوي على DNase I (مكوَّن من 260 حمض أميني) بشري مأشوب (recombinant). يُنتج هذا الأنزيم المأشوب في خلايا مبيض الهامستر الصيني (CHO) كخلايا مضيفة، باستخدام مُقحم يحتوي على ديهيدروفولات ريدكتاز (DHFR-containing insert) في وسط يحتوي على الميثوتريكسات (methotrexate) للحصول على عطاء مرتفع. وبما أن الـ DNase I يُثَبَّط بالأكتين G، (G-actin) الموجود في النخامة، فقد تم هندسة أنزيمات مطفَرة لا تُثَبَّط، وبالتالي لها فعالية أكبر بعشر مرات في النخامة. إن التليف المثاني هو مرض ناجم عن مورث واحد (monogenetic disease) لذا يمكن الاستفادة من العلاج الجيني (gene therapy) في علاجه.

غلوكوسيريبروزيداز (Glucoceribrosidase). داء غوشِيه (Gaucher's disease) عبارة عن مرض تخزين وراثي. ينتج من عدم تشكل أنزيم الغلوكوسيريبروزيداز، مؤدياً ترسّب كميات كبيرة من الغلوكوسيريبروزايدز في بعض أنواع الخلايا. لقد تم تمييز ثلاثة أنواع من داء غوشِيه. يعاني مرضى الشكل الأول الأكثر شيوعاً، ألماً في العظام والجهاز الهضمي، ولكن من دون أعراض عصبية. يمكن علاج هؤلاء المرضى بنجاح عن طريق حقن الغلوكوسيريبروزيداز البشري وريدياً؛ حيث يمكن الحصول عليه من المشيمة. لكنه مؤخراً أصبح يفضل إنتاجه مأشوباً في خلايا مبيض الهامستر الصيني (CHO)، كما تم أيضاً وصف استخدام خلايا نباتية مأشوبة في إنتاجه.

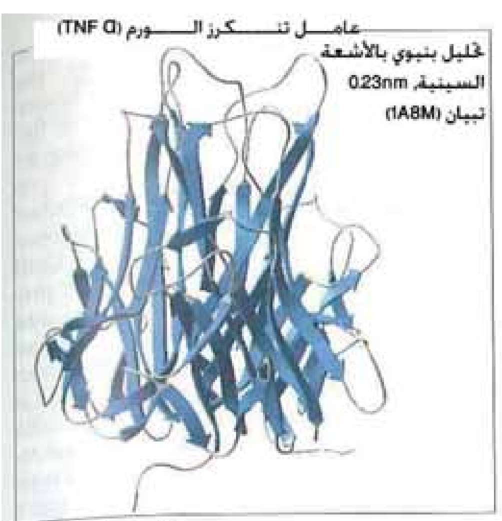
DNase I

تحليل بنيوي بالأشعة السينية، 0.28nm تبيان، مع بلورات مصاحبة للـDNA. DNase I من بنكرياس بقري (1ATN)



عامل تنكرز الورم (TNF α)

تحليل بنيوي بالأشعة السينية، 0.23nm تبيان (1A8M)



التليف المثاني

تناقص إفراز الكلوريد من الخلايا الظهارية، وتشكل المخاط في الرئة.

لدى القوقازيين: هناك فرد واحد متماثل اللواقح في كل 2000 مولود، وفرد واحد متخالف اللواقح في كل 28 فرد. العمر المتوقع لمتماثلي اللواقح <30 سنة

العلاج

إستخدام الـDNase البشري كبخاخ

منظم غشاء التليف المثاني (CFTR)، هو عبارة عن بروتين غشائي مكون من سلسلة واحدة عديدة الببتيد تضم ~2170 حمض أميني يُشفَّر له على الصبغي 7 (7q31). تتمثل الطفرة الأكثر شيوعاً (~70%) في هذا البروتين في حذف الفينيل ألانين في الموقع 508 (ΔF508)

سلاسل السكريات

الغشاء الخلوي

الجزء الموجود في العصارة

ATP

ATP

كلوريد

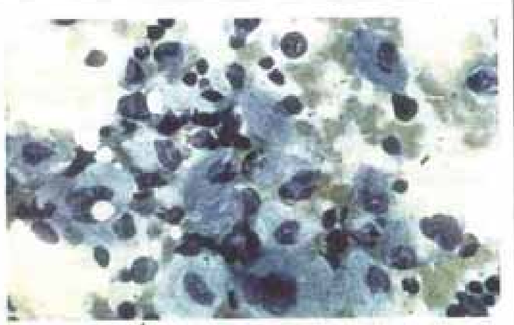
فوسفات

مرض غوشيه

فقدان أنزيم غلوكوسيريبروزيداز-β الفعال وظيفياً والذي يُشفَّر له على الصبغي 1 (1q31)، ما يؤدي إلى شذوذات دموية، قصور وظيفي في الرئة، خلل في العظام والأعصاب.

العلاج

بواسطة غلوكوسيريبروزيداز-β بشري مأشوب



النخاع العظمي المنتشر مع بالعات ملونة (بالأزرق)، وهو شكل نموذجي لمرض تخزين الجسيمات الجهرية (microsomal deseases)

CH_2OH — O — O — C H_2 — HN — O — $[\ ]_9$ — OH — $[\ ]_6$

غلوكوسيريبروزيداز

تحويل أنزيمي	إسترجاع	مفاعل خلوي	خلايا CHO
تفكك جزئي للسلاسل السكرية	ترشح فائق، كروماتوغرافيا	بحجم يصل حتى 2000L	مع بلازميد pGB20، الذي يُشفر للغلوكوسيريبروزيداز-β (1 191bp)

● اللقاحات (Vaccines)

عموميات (General). يمكن تأمين الحماية المؤقتة ضد الفيروسات أو البكتيريا أو السموم (مثلاً، بعد عضة أفعى)، بحقن أجسام مضادة (antibodies) نوعية (متخصصة) بالمستضد (antigen) المعنِي (ما يعرف بالتمنيع السلبي (passive immunization)). إلا أنه يمكن الحصول على حماية أفضل وأدوم إذا ما تم تنشيط الجهاز المناعي لإنتاج الأجسام المضادة المناسبة من خلال حقن اللقاحات (مايعرف بالتمنيع الفعال (active immunization)). فبعد التمنيع، يقوم الجهاز المناعي بانتاج اللمفاويات البائية (B lymphocytes)، التي تُفرز أجساماً مضادة نوعية (متخصصة) بالعامل المُمرِض؛ واللمفاويات التائية (T lymphocytes)، التي تحطم المادة المستضدة الغريبة؛ وخلايا الذاكرة البائية والتائية الطويلة العمر، التي تتفاعل مع الاستجابة المناعية فوراً في حالة ظهور المستضد مجدداً. يمكن أن تكون اللقاحات عبارة عن خلايا كاملة، أو مكونات خلوية (مثل عديدات السكاريد الدهنية للجدار الخلوي)، أو بروتينات سامة (السموم). لذا تستخدم مواد مستضدة مُعطَّلة (inactivated)، أو فيروسات مضعَّفة (مخففة (attenuated)) أو كائنات مجهرية ما زالت مستمنعة (immunogenic) لكنها فقدت خصائصها الممرضة كلقاحات من أجل التمنيع الفعّال. يتم الحصول على الفيروسات المخففة عبر سلسلة من التمريرات الخلوية. فقد تم خلال عقود عديدة، إنتاج عدد كبير من اللقاحات لحماية الإنسان، مثلاً، ضد الحصبة (measles)، والخانوق (diphtheria)، والكزاز (tetanus)، والسعال الديكي (whooping cough)، والسل (tuberculosis)، والكوليرا (cholera) وشلل الأطفال (polio). كما يتم في بعض البلدان تلقيح حيوانات الحراثة ضد داء الحمى القلاعية مثلاً (foot-and-mouth disease). وبالرغم من هذا التطور، ما زال عدد لا بأس به الأمراض بدون لقاح متاح. فهناك طيف واسع من الأمراض المدارية والـ AIDS هي مقاومة للتلقيح.، كما عادت عدة أمراض معدية، مثل داء السل، بعد أن اعتُقِد أنها انقرضت. إضافة إلى ذلك، إن المقاومة المتزايدة التي تبديها بعض الأمراض لأي علاج بمضادات الحيوية (antibiotics) تزيد من هذا التطور الخطير. إلا أنه، ولحسن الحظ، فتحت طرائق الهندسة الوراثية طريقاً جديداً لتحضير لقاحات جديدة عالية النقاوة.

تحضير اللقاح (Vaccine preparation). تتمثل الطريقة التقليدية بتحضير (تصييغ) مادة مستضدة (antigenic) مُعطلة (inactive) أو مخففة (attenuated) لتعطى تحت الجلد (subcutaneous)، أو داخل العضل (intramuscular) أو عن طريق الفم (oral). عادةً ما تُستَخدم سلالات من ممرضات فَقَدَت خصائصها الإمراضية، لكنها مازالت منشطة للاستجابة المناعية. كما أنه وكبديل من ذلك، يمكن زرع المُمرض أولاً في المختبر، ثم القيام بتعطيله من طريق التسخين أو المعالجة بالفورم ألدهايد (formaldehyde)، مع المحافظة على خاصية استمناعه. أما تحضير لقاحات ضد ممرضات ميكروبية أو سموم، فيتم زرع الكائنات المجهرية في مفاعلات حيوية (bioreactors). حتى حوالى عام 1970، كانت تُنتَج الفيروسات في أجنة بيوض الدجاج ثم يتم تنقية الغلاف البروتيني للفيروس من ألبومين البيض ليستخدم في التلقيح. حالياً تفضل طريقة أخرى تقوم على إكثار الفيروس في خلايا حيوانية باستخدام تقانة زرع الخلايا الحيوانية. ولإنتاج الفيروسات المخففة، عادةً ما تستخدم كلتا الطريقتين؛ بحيث تضعَّف أكثر أو يتم تعطيلها بالمعالجة بواسطة الحرارة أو الفورم ألدهايد بعد عزلها من بيض الدجاج أو الزرعة الخلوية. ونظراً إلى المخاطر الكامنة خلال عمليات التخمير والاسترجاع (recovery)، تتم كافة المراحل بما فيها تشكيل المستحضر، تحت مقاييس (standards) أمانية عالية. كما يتم اختبار فعالية وثبات المنتج على الحيوانات (اختبارات الإطلاق (release tests)).

أمثلة. يحدث الكزاز (tetanus) بسبب إصابة جرح ما ببكتيريا الـ *Clostridium tetani*، التي تقوم، أثناء النمو اللاهوائي (anaerobic growth)، بإفراز بروتين عصبي سام (neurotoxic protein) يتم نقله بالدم إلى الأعصاب، ما يؤدي إلى شلل تصلبي (تشنجي). لتحضير سمّ الكزاز، تزرع سلالة عالية الإنتاج لهذا السمّ في مفاعل حيوي (bioreactor) (سلالة Harvard)، بحيث تتحلل ذاتياً (autolysed) عند انتهاء نموها، وبالتالي تحرر السمّ. وبعد إزالة أشلاء الخلايا بالترشيح، يتم تعطيل السم لمدة أربعة أسابيع بحوالى 0.5٪ محلول من الفورم ألدهايد للحصول على سم معطَّل (toxoid)، الذي تتم تنقيته بالترشيح المرافق للانفكاك (diafiltration) وبالترسيب الملحي، ثم يُمتص على أملاح الألمنيوم لزيادة خصائصة المستمنعة (تأثير المساعد (adjuvant effect)). في النهاية، تختبر قدرة اللقاح في التحضيرة (lot) على الاستمناع والتحمل (tolerability) على الحيوانات. أما من أجل الحصول على لقاح الحصبة، فتُلقح (innoculation) خلايا حيوانية أو بشرية بسلالة فيروس منخفضة الخبث (virulence) (سلالة إدمونتون (Edmonton)). ثم بعد حل (lysis) الخلايا المضيفة، يُعزَل الفيروس بالطرد المركزي الفائق المناطقي ذي الجريان المستمر (continuous flow zonal ultracentrifugation) ثم ينقَّى لإعطاء مستحضر مجفد (freeze-dried) أو سائل عالي الثباتية عند التخزين.

التقنيات الأساسية

التمنيع السلبي

إستعمال أجسام مضادة

التمنيع الفعال

[1] تلقيح وقائي
[2] تلقيح عن طريق الفم
- مرض معطل
- مرض مخفف (مضعّف)
- مستضدات خاصة بالمرض
- DNA المرض

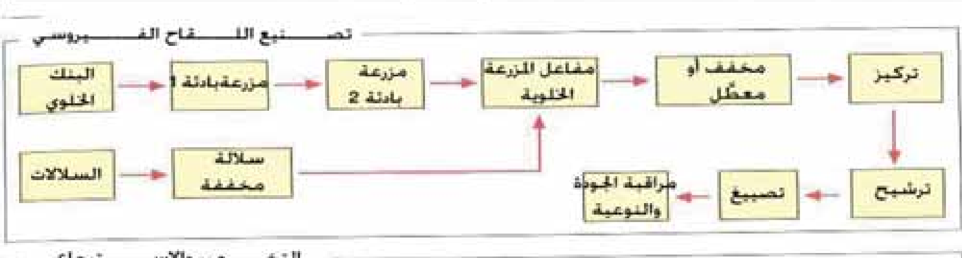
[1] للإصابات على مستوى الأجهزة
[2] للإصابات الوضعية

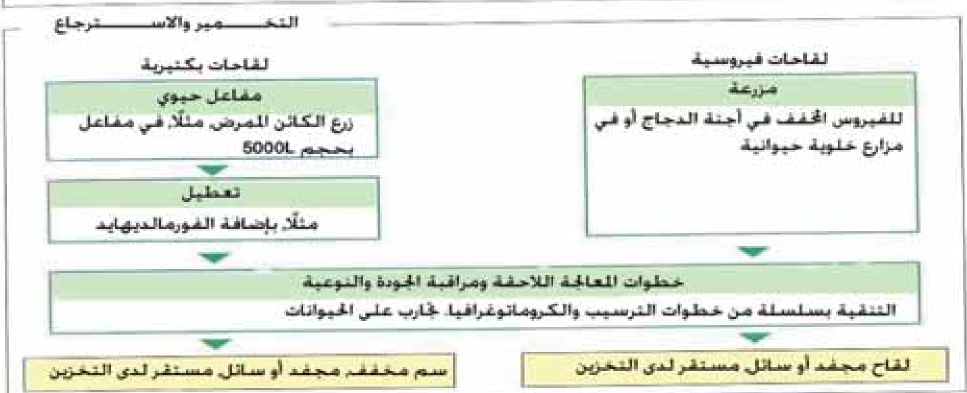
الخلل في التلقيح		
المرض	عدد الحالات السنوية (بالملايين)	عدد الوفيات في السنة (بالآلاف)
الاسهال	4000<	400<
أمراض مختلفة تسببها الديدان	2000<	20<
الأمراض التنفسية	350<	4000<
الملاريا	300<	1<
البلهارسيا (Schistosomiasis)	250<	10<
الحصبة المدارية	44<	1000<
داء شاغاس (chagas)	25<	مرتفعة
مرض السل	6<	2000<
متلازمة نقص المناعة المكتسبة (AIDS)	5<	150<

أمثلة عن اللقاحات المتوفرة

	اللقاح	التطبيق	التصنيع
[1]	BCG	مرض السل	لقاح مخفف حي من *Mycobacterium bovis*
[1]	الحصبة الألمانية أو الحميراء (Rubella)	الحصبة	لقاح حي باستخدام فيروس الحميراء (*Rubella* virus) المخفف
[2]	التهاب سنجابية النخاع (Poliomyelitis)	شلل الأطفال	لقاح حي باستخدام فيروس التهاب سنجابية النخاع (Poliomyelitis) المخفف
[1] [2]	الكوليرا	الكوليرا	سلالات معطلة من *Vibrio cholerae*، لقاحات معدلة حية
[2]	حمى التيفوس	حمى التيفوس	سلالات مخففة من *Salmonella typhimurium*
[1]	الناعور	التهاب السحايا	كبسولة عديدة الساكاريد منقاة من *Haemophilus influenzae*
[1]	FMD	الحمى القلاعية (foot and mouth disease)	فيروس الحمى القلاعية المعطل بالأزيريدين (aziridine)

* التخفيف: هو إضعاف الكائن الممرض من خلال تمريره بشكل متكرر في الزرعات الخلوية





اللقاحات المأشوبة (Recombinant vaccines)

عموميات (General). لقد فتحت إجراءات الهندسة الوراثية إمكانيات جديدة لتحضير اللقاحات. فهي تتيح تصنيع مكونات اللقاحات بنقاوة عالية، كما أنها تقود إلى استراتيجيات تلقيح جديدة تماماً. من الأمثلة على ذلك: دمج مكونات اللقاح في غلاف فيروسات غير مضرة، التعبير عن اللقاحات في نباتات محورة وراثياً (transgenic) أو في حليب حيوانات محورة وراثياً (كلا الإجراءات تؤدي إلى التمنيع (immunization) عن طريق تناول الغذاء)، والتلقيح بالتعداء (transfection) المباشر بالـ DNA. غير أنه، لم يصل حتى الآن إلى الأسواق العالمية إلا مكون لقاح مأشوب واحد، وهو يمنع الإصابة بالتهاب الكبد B، (hepatitis B).

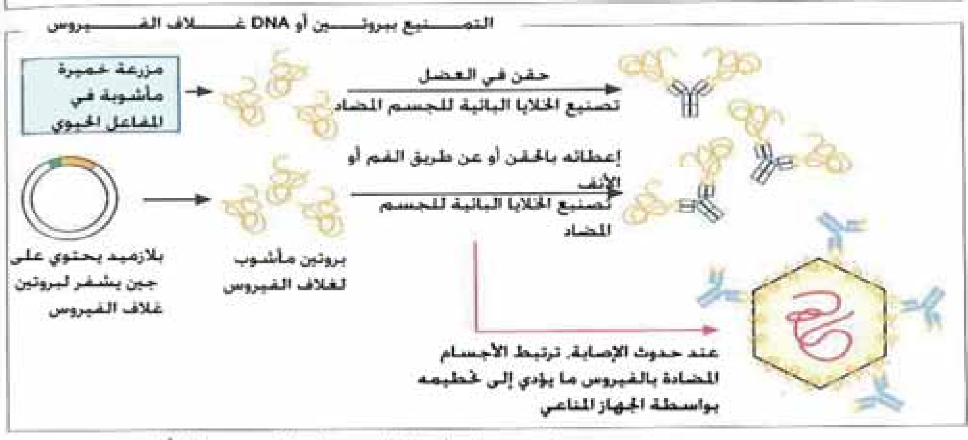
الاستراتيجيات (Strategies). يمكن باستخدام طرائق الهندسة الوراثية الحصول على مركب لقاحات موجه نحو مكونات الخلية المنفردة من العامل الممرض (pathogen)، مثل، بروتينات السطح. لكن هذه العملية تستوجب معرفة المكونات المستمنعة (immunogenic) عند الممرض. والمثال الناجح على هذه الاستراتيجية هو إنتاج لقاح التهاب الكبد B المأشوب (recombinant). يعتبر التهاب الكبد B في بلدان عديدة من آسيا مرضاً متوطناً (endemic)، لم يُكتشف في 90٪ من الحالات، ويؤدي إلى مرض كبدي مزمن عند 5٪ من المرضى. يقدر عدد الأشخاص الذين يعانون التهاب الكبد B بحوالى بليون شخص. ولتحضير اللقاح المأشوب الخاص بهذا المرض، تم عزل مستضد السطح (HbsAg) لفيروس التهاب الكبد B من بلازما دم مرضى مصابين، ثم جرت سلسلته، وبعد ذلك كلونته (cloned). يمكن التعبير عن هذا اللقاح في الـ *E.coli*، أو، تفضيلياً، في خميرة *Saccharomyces cerevicia*. أما تنقية هذا البروتين الذي تم إفرازه فتُنفذ بسلسلة من خطوات الكروماتوغرافيا. والاستراتيجية الأخرى لإنتاج لقاحات مأشوبة تتمثل بتحضير سلالات مضيفة مخففة وراثياً (genetically attenuated strains). على سبيل المثال، بكتيريا الـ *Vibrio cholera*، وهي السلالة المسؤولة عن الإصابة بالكوليرا، التي تُنتِج عادةً سم الكوليرا الذي هو بروتين مندمج (fusion protein) يمتلك فعالية الأدينيلات سايكلاز (adenylate cyclase). يؤدي هذا السم بعد إفرازه داخل الأمعاء الدقيقة إلى تشكيل الأدينوزين أحادي الفوسفات الحلقي (cAMP)، مسبباً فقدان كمية كبيرة من السوائل والكهارل (electrolytes) من جراء الإسهال الشديد. لقد تم تحضير طافرة حذف (deletion mutant) من الـ *V.cholerae* بواسطة تقانات الهندسة الوراثية أدت إلى فقدان فعالية الأدينيلات سايكلاز والإبقاء على الخصائص المستمنعة المشتركة مع السلالة الممرضة، وبالتالي يمكن استخدامها بشكل آمن في التلقيح. وكاستراتيجية ثالثة، تم اقتراح ناقل لقاحات: وهو يتضمن التلقيح بـ DNA فيروسي تم تعديله من أجل أن يُشفر للبروتينات المستمنعة المرغوبة، لكنه فاقد لكل العناصر الممرضة. ولذلك، تم اختيار فيروس جدري القطعان (cattle pox virus) أو الفاكسينيا (vaccinia) للاستخدام كناقل كونه عالي القدرة على العدوى (infective)، لكنه غير مؤذٍ للإنسان على الإطلاق؛ حيث تمّت هندسة مستضدات فيروسية في جينوم الفاكسينيا بنجاح، كما أدت بعد الإصابة إلى التمنيع (immunizing) ضد البروتين G، (G protein) لفيروس الكلَب (rabies virus)، والمستضد السطحي لفيروس التهاب الكبد B، وبروتينات NP وHA لفيروس الانفلونزا، بالإضافة إلى مستضدات أخرى. إلا أن المفهوم العام لهذه الاستراتيجية اعتبر غير آمن بشكل كاف خاصة بالنسبة إلى الأطفال أو المرضى المكبوحي المناعة (immunosuppressed).

النباتات المحورة وراثياً (Transgenic plants). لقد تم اقتراح استخدام النباتات المحورة وراثياً في برامج التلقيح (vaccination) في الدول النامية (اللقاحات القابلة للأكل، مثل، الموز المحور وراثياً). وبما أنه سيتم تناول اللقاح عن طريق الجهاز الهضمي (كما يحدث في التلقيح الفموي)، فإن فعاليته تتعلق بثباته أثناء عبوره المعدة والأمعاء ونقله عبر الأغشية المخاطية، حيث يجب أن يُنَشط الجهاز المناعي للأمعاء الدقيقة لإنتاج الأجسام المضادة. إلا أن هذا المفهوم أيضاً أثار عدداً من الأسئلة التنظيمية والرقابية، كالإنتاج المتساوق وسلوك بروتين اللقاح أثناء نضج، أو فساد، أو معالجة الفواكه أو المنتجات الغذائية الأخرى.

لقاحات الـ DNA. بعد حقن الـ DNA، الذي يُشفر للبنى السطحية لعامل الملاريا الممرض *Plasmodium falciparum*، في طحال الفأر، قامت هذه الحيوانات الملقحة بإنتاج أجسام مضادة ضد هذا الطفيلي. وعلى نحوٍ مشابه من التجارب باستخدام موجز من جينوم الـ *Mycobacterium tuberculosis*، الممرضة والمسببة لداء السل، فقد أدت إلى تفعيل الخلايا التائية (T-cells) كما سمحت بالتعرف على منتجات الجين المكلون مؤدية إلى نشوء استجابة مناعية. في كلتا الدراستين، تم إدخال الـ DNA النوعي بالمستضد في بلازميدات (plasmids)، إلا أن هذه الطريقة الحديثة والمثيرة للاهتمام مازالت في طور البداية.

اللقاحات المأشوبة (انتقاء)			
		المستضد	الوضع
فيروسات	التهاب الكبد B	مستضدات السطح	مسجل
	الهربس البسيط النوع 2	مستضدات السطح	دراسات سريرية
	لقاح الكلب	مستضدات السطح	غير مسجل
	فيروس الحمى الصفراء	مستضدات السطح	دراسات قبل سريرية
	فيروس متلازمة نقص المناعة المكتسبة(AIDS)	مستضدات السطح	دراسات سريرية
بكتيريا	*Sreptococcus pneumoniae*	عديد ساكاريد مقترن	مسجل
	Clostridium tetani	ذيفان (سم) الكزاز	غير مسجل
	Mycobacterium tuberculosis	مستضدات السطح	دراسات سريرية
طفيليات	*Plasmodium falciparum*	(الملاريا)	دراسات سريرية
	أنواع *Trypanosoma*	(مرض النوم)	دراسات سريرية
	Schistosoma mansoni	(البلهارسيا)	دراسات سريرية







• الأجسام المضادة (Antibodies)

عموميات (General). إن الأجسام المضادة هي عبارة عن بروتينات دفاعية نوعية تجول في دم ولمف الكائنات الحية الفقارية. وهي تتشكل لدى التقاء اللمفاويات البائية (B-lymphocytes) مع مستضدات مستمنعة (immunogenic antigens)، بحيث ترتبط بألفة (affinity) عالية مع هذه المستضدات. يمكن لغالبية البروتينات الغريبة، وعديدات السكاريد، وعديدات السكاريد الدهنية (lipopolysaccharides) أن تكون مستضدات، مثل، الجزيئات الضخمة التي تكوّن سطح خلايا الفيروسات والكائنات المجهرية والطفيليات (parasites)، وبالتالي تؤدي، إضافةً إلى البروتينات السامة (السموم)، إلى تشكيل أجسام مضادة. وحتى المركبات ذات الوزن الجزيئي الصغير، يمكن أن تكون باعثاً على تشكيل الأجسام المضادة إذا ما وُجدت على سطح بنى مستمنعة بقوة (تُعرف بالناشبة (hapten)). أما في أمراض المناعة الذاتية (autoimmune deseases)، فإن بروتينات الكائن الحي نفسه تصبح «غريبة» وتقوم بتطوير خصائص مستضدة. تُستخدم الأجسام المضادة منذ وقتٍ طويل في علاج الإصابات والسموم (مثل علاج عضّات الأفاعي) بالتمنيع السلبي (passive immunization). فهي تمتلك قيمة كبيرة كمجموعات مبلِّغة (reporter groups) في التحليل المناعي (immunoanalysis). كما تستخدم صناعياً في تنقية بعض البروتينات المأشوبة (recombinant)، مثل، العامل الثامن بطريقة الكروماتوغرافيا المناعية (immunochromatography).

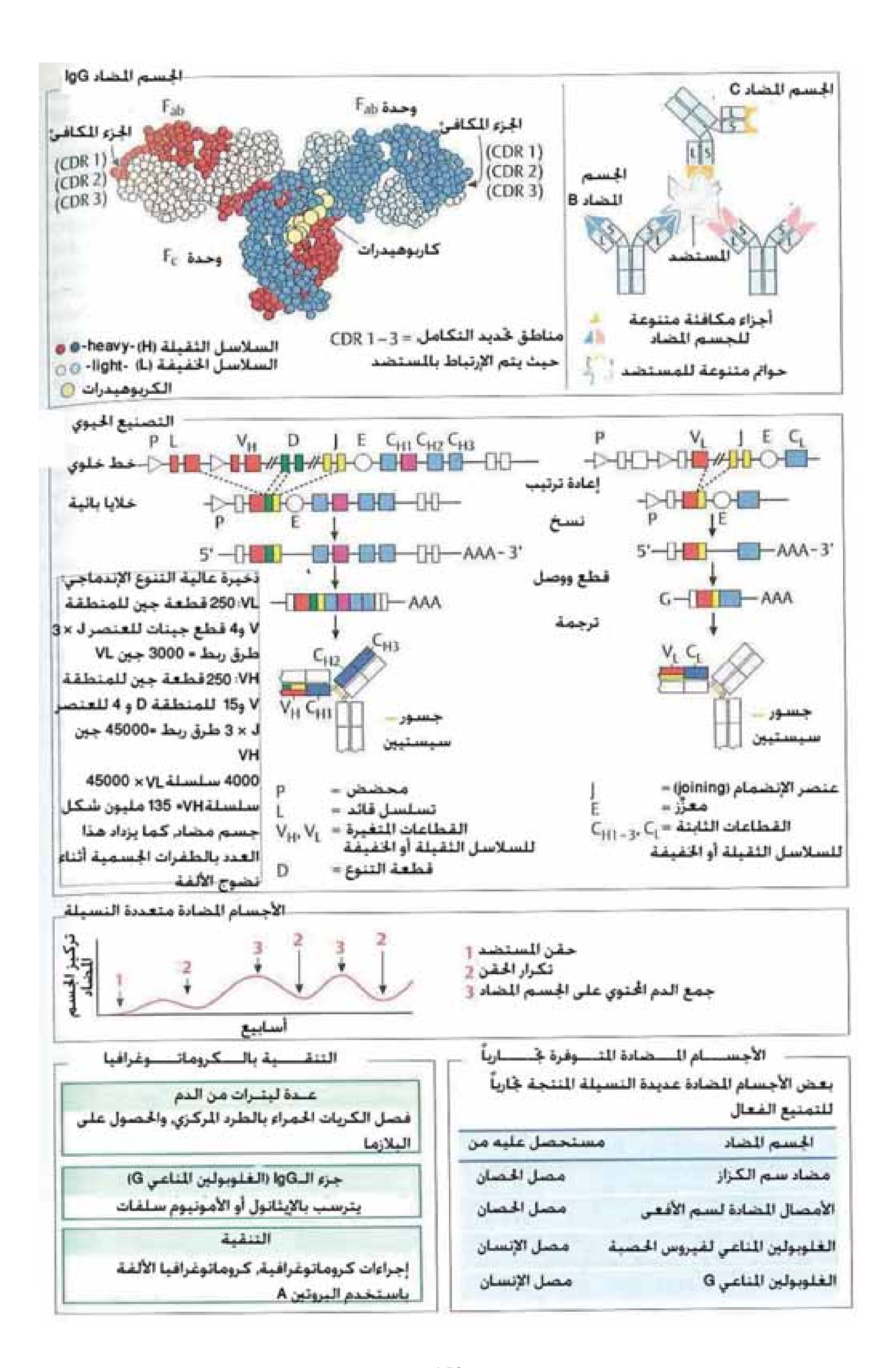
البنية. تنتمي الأجسام المضادة إلى الغلوبولينات المناعية ((immunoglobulins (IG)). وهي تُصنَّف عند الإنسان في خمس مجموعات (IgG، IgM، IgA، IgE وIgD)، حيث إنها تلعب أدواراً مختلفة في الدفاع المناعي. إن الـ IgG المسيطر في المصل، هو عبارة عن جسم مضاد ثنائي الأجزاء غير المتجانسة (heterodimer)، مكوَّن من سلسلتين متماثلتين خفيفتين (L) وأخريين ثقيلتين (H) مرتبطتين ببعضهما البعض بجسور سيستيين (cysteine bridges). تمتلك هذه البنى قطاعات (domains) ذات تسلسل ثابت (C_L وC_H) وقطاعات ذات تسلسل متغير (V_L وV_H) يمكن تمييزها في السلاسل الثقيلة والخفيفة. إضافةً إلى ذلك، ترتبط منطقة F_c من الجسم المضاد بالمستقبل، ومنطقة F_{ab} التي تكون عالية التغير (hypervariable) بالمستضد: إذ تتكون كل منطقة من مناطق تحديد التكامل (complementarity-determining region ((CDRs)) الست من حوالى 20 حمضاً أمينياً، لذا فإن كل CDR تسمح بإيجاد 20^{6x20} تبديل (permutations).

التصنيع الحيوي (Biosynthesis). تُصنَّع الأجسام المضادة بواسطة الخلايا اللمفية البائية (B-lymphocytes)، التي تمتلك حوالى 1000 مجموعة من قطع الجينات المتوفرة. تجتمع قطع الجينات هذه بشكل عشوائي (الخلط الجيني (gene schuffling) لتشفر للمنطقة المتغيرة (variable region) من الغلوبولينات المناعية. إضافة إلى ذلك، خلال تضخم كلونات (clones expansion) الخلايا البائية، تحدث طفرات (mutations) في الجينات المسؤولة عن المناطق المتغيرة. لذا فإن نمطاً وراثياً (genotype) صغيراً نسبياً يُشفر للأجسام المضادة يؤدي إلى تنوع هائل في النمط الظاهري (phenotype).

التحضير (Preparation). إن الأجسام المضادة عديدة النسيلة (polyclonal antibodies) هي عبارة عن مزائج من الأجسام المضادة المختلفة الموجهة نحو حواتم مختلفة (epitopes) في نفس المستضد. يتم الحصول عليها بتمنيع حيوانات مثل الأرانب، والنعاج، والماعز والخيول؛ حيث يمكن من خلال التمنيع المتكرر بعد فترات فاصلة تبلغ عدة أسابيع ثم استخلاصها من الدم، الحصول مراراً على دفعات ـ تحضيرات ـ (lots) متشابهة من الأجسام المضادة من نفس الحيوان (الحصان، الماشية، النعجة). تتم تنقية هذه الأجسام المضادة بالترسيب وبعمليات الكروماتوغرافيا (chromatograpy). ولإنتاجها بنقاوة عالية، يمكن استخدام طريقة كروماتوغرافيا الألفة المعتمدة على البروتين A، الذي يتم الحصول عليه (ذو وزن جزيئي يبلغ 42kDa) من بكتيريا الـ *Staphylococcus aureus*. فهو يرتبط بنوعية (specificity) وألفة مرتفعتين بمنطقة F_c من الـ IgG. بعد ذلك، تُجزأ محاليل الـ IgG المنقاة بطريقة معقمة وتجفد (lyophilized) بغياب الهواء. وهي تكون ثابتة لعدة سنوات إذا ما خزنت بالتبريد، حيث يتم إنتاجها صناعياً تحت شروط الممارسات التصنيعية الجيدة (GMP).

المخاطر (Risks). تعطى الأجسام المضادة عن طريق غير الفم (parenterally) في علاج الإنسان، لأنها غير ثابتة في الجهاز الهضمي. كما يتعرف الجهاز المناعي لدى الإنسان على الأجسام المضادة التي تم الحصول عليها من الحيوانات على أنها غريبة، مما يكون باعثاً على نشوء دفاع مناعي، خاصةً بعد الحقن المتكرر. يمكن حل هذه المشكلة بتغيير مصدر الأجسام المضادة والحصول عليها من أنواع حيوانية مختلفة. وكبديل، يمكن الحصول عليها من دم متبرع. وبالرغم من إخضاع الدم المعطى المخزن في بنوك الدم إلى فحص دقيق قبل الاستخدام، إلا أن خطر التلوث بفيروس التهاب الكبد أو الـ AIDS يبقى قائماً.

التطبيقات (Applications). تستخدم الأجسام المضادة بشكل رئيسي في تشخيص وعلاج الأمراض البشرية وكأدوات تحليلية في البيولوجيا الجزيئية والخلوية. كما تم استعمالها مؤخراً في التحاليل الغذائية والبيئية.



الجسم المضاد IgG
Fab
Fab وحدة
الجزء المكافئ
الجزء المكافئ
(CDR 1)
(CDR 2)
(CDR 3)
(CDR 1)
(CDR 2)
(CDR 3)
كاربوهيدرات
Fc وحدة
السلاسل الثقيلة heavy- (H)
السلاسل الخفيفة light- (L)
الكربوهيدرات
مناطق تحديد التكامل = CDR 1-3
حيث يتم الإرتباط بالمستضد
الجسم المضاد C
الجسم المضاد B
المستضد
أجزاء مكافئة متنوعة للجسم المضاد
حوائم متنوعة للمستضد
التصنيع الحيوي
خط خلوي
إعادة ترتيب
خلايا بائية
نسخ
قطع ووصل
ترجمة
P L VH D J E CH1 CH2 CH3
P VL J E CL
5' AAA-3'
G AAA
CH2 CH3
VH CH1
VL CL
جسور سيستين
جسور سيستين
ذخيرة عالية التنوع الإندماجي
VL: 250 قطعة جين للمنطقة V و4 قطع جينات للعنصر J × 3 طرق ربط = 3000 جين VL
VH: 250 قطعة جين للمنطقة V و15 للمنطقة D و 4 للعنصر J × 3 طرق ربط =45000 جين VH
4000 سلسلة VL × 45000 سلسلة VH= 135 مليون شكل جسم مضاد كما يزداد هذا العدد بالطفرات الجسمية أثناء نضوج الألفة
P = محضض
L = تسلسل قائد
VH, VL = القطاعات المتغيرة للسلاسل الثقيلة أو الخفيفة
D = قطعة التنوع
J = عنصر الإنضمام (joining)
E = معزّز
CH1-3, CL = القطاعات الثابتة للسلاسل الثقيلة أو الخفيفة
الأجسام المضادة متعددة النسيلة
تركيز الجسم المضاد
أسابيع
1 حقن المستضد
2 تكرار الحقن
3 جمع الدم المحتوي على الجسم المضاد
التنقية بالكروماتوغرافيا
عدة لبترات من الدم
فصل الكريات الحمراء بالطرد المركزي والحصول على البلازما
جزء الـIgG (الغلوبولين المناعي G)
يترسب بالإيثانول أو الأمونيوم سلفات
التنقية
إجراءات كروماتوغرافية، كروماتوغرافيا الألفة باستخدم البروتين A
الأجسام المضادة المتوفرة تجارياً
بعض الأجسام المضادة عديدة النسيلة المنتجة تجارياً للتمنيع الفعال
الجسم المضاد | مستحصل عليه من
مضاد سم الكزاز | مصل الحصان
الأمصال المضادة لسم الأفعى | مصل الحصان
الغلوبولين المناعي لفيروس الحصبة | مصل الإنسان
الغلوبولين المناعي G | مصل الإنسان

الأجسام المضادة وحيدة النسيلة

(Monoclonal antibodies)

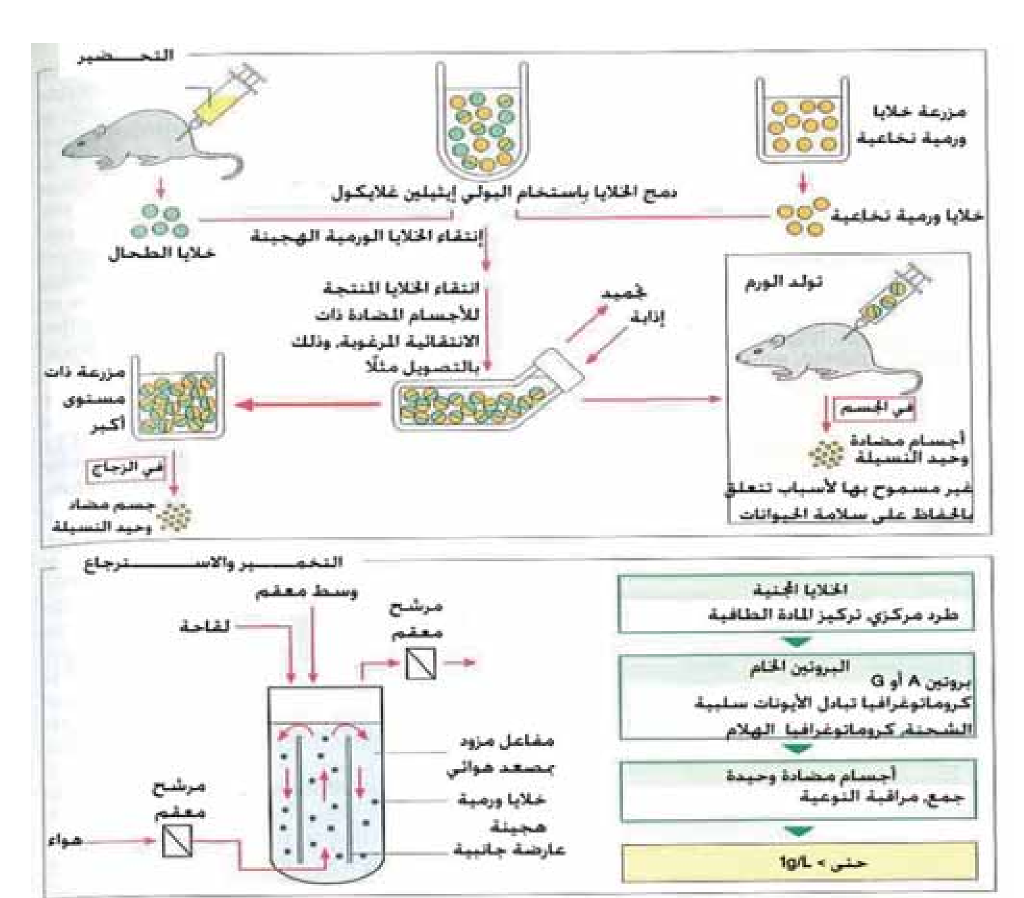
عموميات (General) . خلافاً للأجسام المضادة عديدة النسيلة المأخوذة من حيوانات ممنعة (immunized)، التي تتكون من مزيج أجسام مضادة موجهة ضد نفس المستضد (antigen)، فإن الأجسام المضادة وحيدة النسيلة تكون متجانسة : تتكون من نوع واحد من الأجسام المضادة ذات انتقائية (selectivity) وفعالية (activity) محددة. وهي تصنع باستخدام خلايا ورمية هجينة (hybridoma) .

تقانة الورم الهجين (Hybridoma technology) . يتم فيها حقن حيوان التجربة بالمستضد (عادة الفئران وأحياناً الجرذان)، ثم عزل لمفاويات الطحال ودمجها في الزجاج (in vitro مع خلايا ورمية لمفاوية فأرية (خلايا نخاع ورمية (myeloma cells))، لتعطي خلايا قادرة على الانقسام إلى أجل غير مسمى في المزرعة. بعض هذه الخلايا الورمية الهجينة يقوم بالتعبير عن أجسام مضادة على سطحه ضد المستضد، وبالتالي يمكن عزل هذه الخلايا باستخدام معايرات مناعية (immunoassays) وإجراءات الكلونة الخلوية. في النهاية، يتم تجميد الكلونات (النسائل) الأكثر إنتاجاً تحت درجات حرارة منخفضة تجعلها ثابتة لسنوات عدة. تسمح هذه الطريقة بإنتاج أجسام مضادة وحيدة النسيلة نقية موجهة ضد عدد غير محدود من مستضدات وناشبات (haptens) الاختيار بصورة متناتجة.

تصنيع الأجسام المضادة وحيدة النسيلة (Manufacture of monoclonal antibodies) . يمكن للخلايا الورمية الهجينة أن تنقسم وتتكاثر في الزرعة الخلوية بشكل دائم. وهي تقوم بإفراز الأجسام المضادة وحيدة النسيلة التي تصنعها في وسط الزرع بمستوى $10\text{-}30mgL^{-1}$. كما يتم الحصول على كميات أكبر ($800\text{-} > 1000mgL^{-1}$) لدى زراعة الخلايا في مفاعلات حيوية (bioreactors) باستخدام أوساط معقدة. فبالإضافة إلى الغلوكوز ـ D والغلوتامين ـ L (L-glutamine)، استخدم في البداية مصل جنين العجل، نظراً إلى احتوائه على سايتوكينات (cytokines) وعوامل نمو مثل اللاكتوفيرين (lactoferrin) . أما حديثاً، فقد تم تطوير أوساط مصنّعة معقدة على غرار عوامل مصل البقر ((bovin serum factors (BSF) . يمكن للخلايا الورمية الهجينة أن تنمو هوائياً على أسطح صلبة، لكنه أمكن أيضاً أقلمتها للنمو في معلق، مع تطلبها وجود الأكسيجين وثاني أوكسيد الكربون. على المستوى المخبري، تستخدم قوارير زرع دوارة أو دوارق دحرجة (roller flasks) تدور ببطء. أما على المستوى الصناعي، فتستخدم المفاعلات الخلوية؛ التي يجب تحسين شروط التهوئة والمزج فيها كون الخلايا الثديية حساسة لقوى الجز (shear forces) . في البداية، استُخدمت مفاعلات حيوية ذات مساحات سطح داخلي واسع، مثل الحبابات كبيرة المسام (macroporous beads) أو وحدات الألياف المجوفة لحماية الخلايا من التحطم الميكانيكي بفعل التهوئة. بعد ذلك، جرى تطوير شروط الزرعة المعلقة للخلايا الحرة باستخدام مفاعلات الحوض المخفوق (stirred tank reactor) ومفاعلات الحمل الهوائي (airlift reactor) (بأحجام تصل حتى 12500L). تتم عملية التخمير في هذه المفاغلات بنمط الدفعة الواحدة (batch mode) أو بالنمط المستمر : لكنه في الصناعة تفضل أنماط الدفعة المغذاة (fed-batch mode) التي يمكن أن تُنتِج بضعة غرامات من الأجسام المضادة وحيدة النسيلة في ليتر المزرعة. وبالنسبة إلى عملية التنقية، فتتضمن إجراءات التنقية النموذجية، حيث يتم تركيز الوسط بالترشيح الفائق (ultrafiltration) أو بالترشيح المرافَق بالانفكاك (diafiltration)، ليتبعه ربط الأجسام المضادة بعمود من بروتين A (protein A) . كما يمكن لمراحل تنقية إضافية أن تتضمن كروماتوغرافيا التبادل الأيوني (ion exchange chromatography) وإزالة تكتلات الأجسام المضادة والبروتينات الغريبة بواسطة كروماتوغرافيا الهلام (gel chromatography) .

الأجسام المضادة المؤنسنة (Humanized antibodies) . لأن الأجسام المضادة وحيدة النسيلة الفأرية (murine antibodies) تحمل خطر إثارة الاستجابة المناعية لدى استخدامها في العلاج أو التشخيص داخل جسم الإنسان؛ كما أن شدفتها الثابتة المسماة بشدفة F_C قد لا ترتبط بشكل صحيح مع المستقبل البشري؛ إضافةً إلى كون تجارب تمنيع (immunization) الإنسان غير أخلاقية ومن الصعب الحفاظ على خلايا النخاع الورمية (myeloma cells) البشرية في المزرعة، فقد تم تطوير إجراءات أخرى لتأمين أجسام مضادة بشرية. على سبيل المثال، 1) تبين أن مزارع خلايا لمفاوية بشرية تُنتج أجساماً مضادة وحيدة النسيلة، إذا ما تواجد المستضد مع بعض عوامل النمو والسايتوكينات (cytokines) (تمنيع في الزجاج)؛ 2) تم الحصول على أجسام مضادة بعد تنمية لمفاويات بشرية في طحال فأر مصاب بعوز مناعي (imunodeficient)؛ و3) تم الحصول على أجسام مضادة مؤنسنة مأشوبة (recombinant) تحمل شدف CDR فأرية ضمن الجسم الأساسي للجسم المضاد البشري (التطعيم (grafting)).

التطبيقات (Application) . يمكن استخدام الأجسام المضادة وحيدة النسيلة كمستحضرات دوائية حيوية (biopharmaceuticals) لعلاج عدة أمراض مثل الأورام. فهي تعتبر من المستحضرات الدوائية المفتاحية المحضرة في مزارع خلايا ثديية. يوجد حالياً أكثر من 10 أجسام مضادة وحيدة النسيلة مسجلة للعلاج، وأكثر من 100 وصلت إلى مرحلة الاختبارات السريرية.



أن بعض التطبيقات

التطبيق	الاسم التجاري	البروتين المستهدف/الوظيفة	المصدر
التشخيص	عديدة	الغونادوتروبين، هرمون النمو، مستضد سرطان جنيني، مستضد البروستات النوعي، الهيربيس (Herpes)، بكتيريا *Legionella*.... الخ	عادة فأرية
رفض الإزدراع	زيناباكس (Zenapax®)	ازدراع الكلى	مؤنسنة
علم الأورام	سيا-سكان (CEA-Scan®)	مستضد سرطان جنيني	فأرية
	ريتوكسان (Rituxan®)	لمفوما الخلايا البائية (مرض هودجكن ((Hodgkin's disease)	خيمرية (مخلط)
أمراض المناعة الذاتية	ريميكاد (Remicade®)	داء كرون (Crohn's disease)	خيمرية
الأرجية (الحساسية)، الربو	روماب E25 (RhuMab E25)	مضاد الـIgE	مؤنسنة
تعفن الدم	نوراسيبت II (Norasept II)	مضاد عامل تنكرز (نخر) الورم (TNF)	فأرية

الفارية: من الفأر؛ الخيمرية: المناطق الثابتة مأخوذة من جين بشري والمناطق المتغيرة مأخوذة من جين فأري؛ المؤنسنة: مناطق CDR مأخوذة من قوارض تم تطعيمها ضمن مناطق هيكلية بشرية.

الأجسام المضادة المأشوبة والتحفيزية

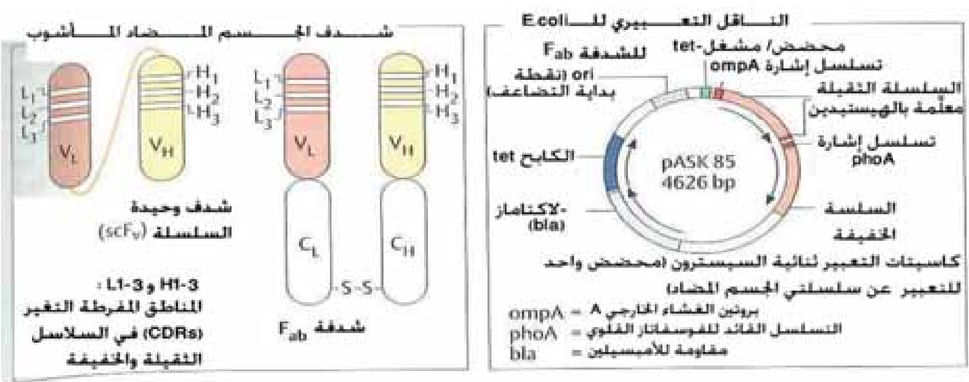
(Recombinant and catalytic antibodies)

عموميات (General). يمكن استخدام طرائق الهندسة الوراثية للتعبير عن الأجسام المضادة الطبيعية أو المعدلة في كائنات حية مضيفة. فإذا تم استخدام كائنات مجهرية، تتشكل عادة شدف الأجسام المضادة، وبشكل خاص، شدف Fv المنفردة السلسلة (scF_v) وشدف F_{ab}. لقد تم الحصول على أجسام مضادة مأشوبة (recombinant) كاملة في خلايا حقيقية النوى (eukaryotes)، وفي نظام الفيروس العصوي (baculovirus)، وفي النباتات المحورة وراثياً (transgenic) («أجسام نباتية» (plantibodies))، وفي حليب حيوانات محورة وراثياً. وهي تملك إمكانيات كبيرة في التشخيص والعلاج. كما تمت دراسة أجسام مضادة ثنائية النوعية (التخصص (bispecific)) وثنائية الوظيفة (bifunctional) لاستهداف أدوية ترتبط كمستضدات إلى النوع الخلوي المرغوب، مثلاً، من أجل إزالة السمّيّة (detoxification)، وكبح المناعة (immunisuppression)، وعلاج السرطان. وقد استخدمت في تحليل البروتيوم (proteome)، إمّا أجسام مضادة نوعية لتعريف بروتينات نوعية بعد فصلها بالهجرة الكهربائية الثنائية الأبعاد وتحديد كميتها، أو صفيفات من الأجسام المضادة مباشرة. وكذلك تمت دراسة الأجسام المضادة التحفيزية من أجل استخدامها في التحفيز الحيوي (biocatalysis).

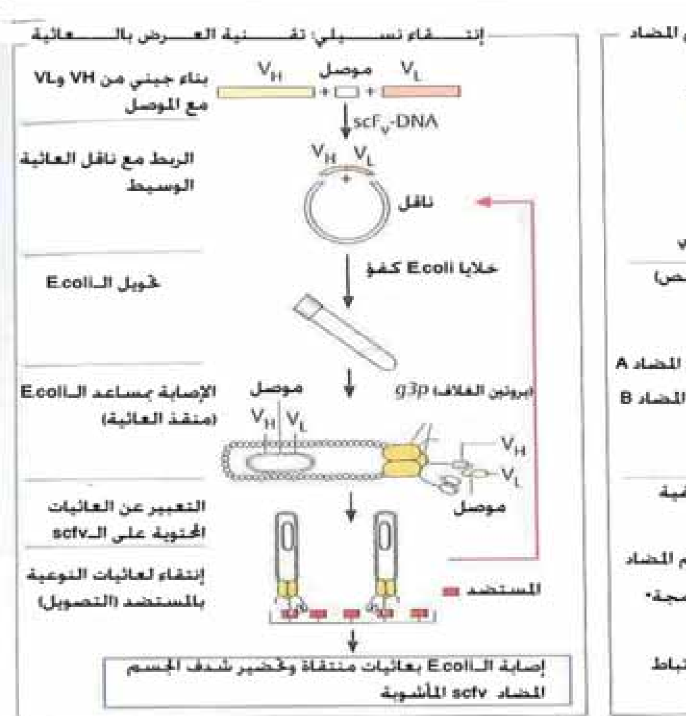
التصنيع (Mnufacture). إن المادة الوراثية البادئة هي الـ DNA المتمم (cDNA)، المشتق إما من الـ RNA الرسول (mRNA) لخلايا النخاع الورمية (myeloma cells) المولَّدة في حيوانات مخبرية ممنعة (immunized)، أو من RNA رسول للمفاويات البائية (B lymphocytes) «الغر» (naive). فبعد كلونتها داخل كائن حي مضيف، يتم إنتاج أجسام مضادة مأشوبة أو شدف (fragments) من الأجسام المضادة. على سبيل المثال، يمكن التعبير عن شدف scF_v أو شدف F_{ab} بالالتفاف (folded) الصحيح في الفراغ المحيط بالغشاء البلازمي (periplasmic space) في الـ *E.coli* وذلك بعد إدخال الـ DNA المتمم، المُشفر لبروتين اندماجي أو للسلاسل المفصولة V_L وV_H، في الناقل λ وتعداء (transfect) الخلايا الكفؤ الكفؤ (competent) به. إلا أن هذه الشدف ينقصها قطاعان وظيفيان: شدفة F_C التي ترتبط مع المستقبل، وقطاع C_H2 المضاف إليه مجموعة الغلايكوزيل (glycosylated). لهذا، يتم إنتاج الأجسام المضادة العلاجية في مزارع خلايا حيوانية مثل خلايا مبيض الهامستر الصيني (CHO). في حين يُعد أيضاً إنتاج الأجسام المضادة الكاملة في النباتات المحورة، وراثياً، مجالَ بحثٍ ناشطاً.

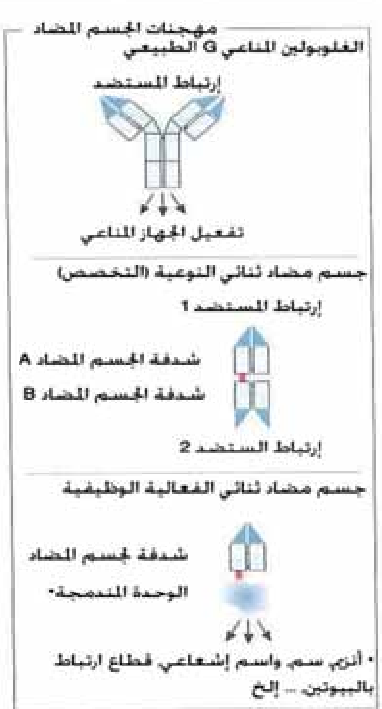
التعديل الاندماجي (Combinatorial modification). تكمن الميزة الكبيرة في إنتاج الأجسام المضادة بتقانات التأشيب، مقارنة بتقانة الورم الهجين (hybridoma technique)، بإمكانية تحضير مكتبات أجسام مضادة كبيرة جداً. تُحضّر عادة هذه الأجسام المضادة المأشوبة بتقانة تسمى «العرض بالعاثية» (phage display). في هذه الطريقة يتم عزل كامل ذخيرة الأجسام المضادة للمفاويات البائية (B lymphocytes) على شكل DNA متمم (cDNA)، بحيث تُدمج مع الجين المُشفر لبروتين الغلاف الفيروسي، وتُجمع داخل نواقل تعبير M13 (expression vectors). ثم بعد إصابة واحدة للمضيف *E.coli*، يمكن تشكيل حتى 10^{10} مساعد عاثي، يعبر على سطحه، تبعاً للـ DNA المتمم المستخدم، عن شدف scF_v أو شدف F_{ab} المشفرعنها في جينوم العاثي. وهكذا، يمكن بسهولة عزل الأجسام المضادة ذات الألفة العالية من هذه المكتبة بواسطة كروماتوغرافيا الألفة، بحيث يبقى الجين المُشفِر ضمن جسيمات العاثي المعزول. لقد أدت طرائق التطفير والانتقاء المتكررة القائمة على أساس خلط السلسلة (chain shuffling)، أو التطفير بالخطأ المُحدَث بالـ PCR (error-prone PCR mutagenesis)، أو سلاسل مطفرة من *E.coli* إلى الحصول، خلال وقت قصير، على أجسام مضادة ذات ألفة لافتة. وبالتالي، من خلال إحداث تطفير موجه تدريجي لمناطق CDR في شدفة جسم مضاد (gp120) المعطلة (neutralizing) للفيروس HIV-1، أمكن زيادة الألفة 420 مرة إلى 15pM. إن هذا المفهوم قد بدأ فعلاً تطبيقه بنجاح لتحضير أجسام مضادة بشرية عالية الألفة، بدءاً من مكتبة DNA متمم مأخوذ من لمفاويات بشرية بائية غر (naïve).

الأجسام المضادة التحفيزية (Catalytic antibodies). وقد تم تحضيرها بتمنيع (immunize) حيوانات بمركبات ذات صلة بالحالة الانتقالية (transition state) لتفاعل محفَز أنزيمياً، وكذلك بإجراءات عرض العاثية. فبهذه الطريقة تم الحصول على أجسام مضادة وحيدة النسيلة أو الأجسام المضادة المأشوبة (recombinant) الفعالة تحفيزياً حتى في التفاعلات التي لا يبدو أنها تحدث في الطبيعة (مثل إضافات ديلس ـ ألدير (Diels-Alder additions)). كما أظهر تحليل هذه الأجسام المضادة بالأشعة السينية (X-ray) تشابهاً وظيفياً مع الموقع الفعال للأنزيمات الموافقة. على سبيل المثال، يحتوي الجسم المضاد التحفيزي 17E8 الذي يحلل (hydrolyse) الفورميل نورلوسين فينيل الاستر (formyl-norleucine phenyl este) على «زوج تحفيزي» من سيرين ـ هيستيدين (ser-his) عوضاً عن الثالوث التحفيزي من سيرين ـ هيستيدين ـ أسبارتات (ser-his-asp) الموجود في أنزيمات السيرين هيدرولاز (serine hydrolyse) التي تحفز نفس التفاعل. إلا أن فعاليات الأجسام المضادة التحفيزية (المحددة بنسبة K_{cat}/K_M) لم تصل بعد إلى فعالية الأنزيمات الموافقة. أخيراً، هناك أدلة على إمكانية وجود الأجسام المضادة التحفيزية في الكائنات الحية.



النظام	الذخيرة	انتقاء نسيلي	زيادة الألفة
تنوع الأجسام المضادة			
اللمفاويات البائية (الجهاز المناعي)	< 10^8 جين	تنشيط خلايا بائية محددة عبر الغلوبولن المناعي (IgM) الموجود على سطحها	اللمفاويات: فرط تطفير جسمي
E.coli	ذخيرة لمفاويات مكلونة بالإضافة إلى جينات مصنعة ذات منطقة تحديد تكامل (CDR) عشوائية تفوق 10^8 جين	التعبير عن شدف الأجسام المضادة على سطح العاثيات متبوعاً بغربلة ألفوية	الخلط الجيني: سلالات مطفّرة، تطفير مُحدَث بالـPCR





التحليل المناعي (Immunoanalysis)

عموميات (General). على الرغم من أن الأنزيمات يمكن أن تسمح بتحديد سريع وكمّي للمركب المُحلّل (analyte) في وسط بيولوجي معقد كالمصل، فإن التحليل المناعي قد تطور ليكون طريقة أفضل، حيث إنه أكثر حساسية ومتعدد الاستخدامات بشكل أكبر بكثير. فقد أدى تطوير المعايرة المناعية الإشعاعية (radioimmunoassay) والمعايرة المناعية الأنزيمية منذ أوائل السبعينيات للحصول على منتجات قدرت قيمتها في السوق عام 2002 بحوالى 6 بليون دولار أمريكي.

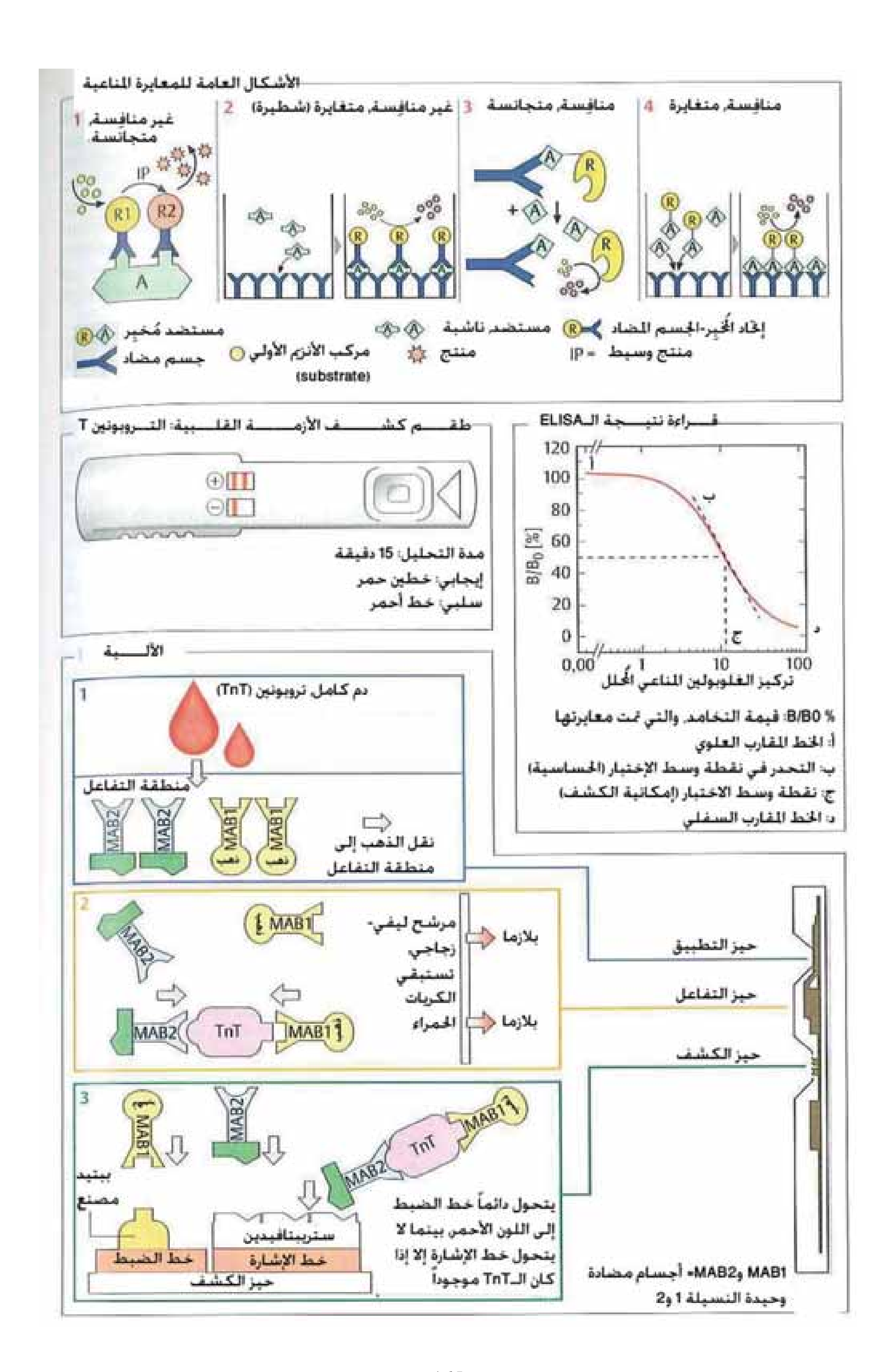
الطرائق (Methods). ترتبط الأجسام المضادة عديدة النسيلة (polyclonal antibodies) ووحيدة النسيلة (monoclonal antibodies) بالمستضدات والنواشب (haptens) بألفة (affinity) عالية (تتراوح K_d عادة 10^{-6}M-10^{-8}). إلا أنه لا يمكن تحديد مدى الارتباط بسهولة. لذا، فقد كان خرقاً كبيراً عندما تم تصميم آليات مبلِّغة (reporter mechanisms) تسمح بتحديد وحساب التنافس بين الأجسام المضادة ومواقع الارتباط بالمستضدات. يتم عادة التمييز بين المعايرات المناعية المتجانسة، التي لا تتطلب خطوة فصل بين الارتباط وتفاعل التبليغ، وبين المعايرات المناعية غير المتجانسة التي تتضمن خطوة فصل لإزالة الفائض من الكاشف ومركبات القالب المتدخل، لكنها تكون بالمقابل أكثر حساسية. لقد تم تصميم أشكال متعددة من الاختبارات تسمح لنوعية (specificity) وحساسية الاختبار بالتأقلم مع المتطلبات الفردية بما فيها اختيار مجموعة التبليغ. فعند استخدام النظائر المشعة (isotops) (المعايرات المناعية الاشعاعية radio immunoassays (RIA))، تتشكل إشارة كشف حدوث الارتباط بنسبة 1 : 1. أما عند استخدام المعايرات المناعية الأنزيمية (المعايرات المناعية الممتزة المتصلة بالأنزيم (ELISAs))، فتحدث مضاعفة إضافية للإشارة عبر التفاعل الأنزيمي. إن المعايرات المناعية الأنزيمية المضبوطة تسمح بشكل جيد بحساسية كشف بدرجة البيكومولار (picomolar) أو حتى الفيمتومولار (femtomolar) (10^{-12}-10^{-15}M)؛ حيث يُستخدم عادةً أنزيم البيروكسيداز المستحصل عليه من نبات الجرجار (horseradish peroxidase) أو الفوسفاتاز القلوي (alkaline phosphatase) كأنزيمات مبلغة.

قراءة النتيجة (Read out). تقرأ نتائج المعايرات المناعية من خلال منحيات معايرة (calibration curves)، وغالباً ما تستخدم صفائح معايرة دقيقة، تحوي 96 أو 384 بئر (فجوة) يتم فيها التفاعل، مع قارئ خاص بهذه الصفائح (مقياس ضوئي (photometer)، أو فلوري (fluorimeter) أو لمعاني (luminometer) دقيق). بهذا الشكل يمكن بسهولة إنشاء منحنيات معايرة مع المعايرات المناعية الموازية.

المركبات المُحلّلة (Analytes). من حيث المبدأ، إن جميع المواد التي يمكن تشكيل أجسام مضادة نوعية (specific) تجاهها ـ إما بشكلها الحر أو مرتبطة بجزيئات حاملة ناشبة (haptens) خاصة ـ هي قابلة للكشف بالمعايرات المناعية. هذه المواد يمكن أن يتراوح وزنها الجزيئي من 10^2 (مثلاً، بعض الأدوية والهرمونات) حتى حوالى 10^6Da (مثلاً، البروتينات عديدة الأجزاء (multimeric)).

شرائح الاختبار (Test strips). كما هو الحال في وسائل التشخيص الأنزيمية، يمكن تطبيق المعايرات المناعية باستخدام شرائح الاختبار التي يتوفر كثيرٌ منها في الصيدليات. على سبيل المثال، يمكن كشف الحمل بتحديد مستوى هرمون مشيمة الجنين البشري المنشط للغدد التناسلية ـ الغونادوتروبين ـ (human chorion gonadotropin (HCG))، الذي يرتفع تركيزه في البول (وفي الدم) بشكل كبير بعد أن تنغرس البويضة المخصبة في الرحم .كما تستخدم شرائح الاختبار في المستشفيات للاختبارات الإسعافية (في حالات العناية المركزة). والمثال النموذجي على ذلك يتجلى في تحليل بروتين التروبونين T، (troponin T)، الذي يتحرر من خلايا عضلة القلب المصابة بعد الأزمة القلبية. في هذه الاختبارات، توضع قطرة دم على الشريحة حيث يتم تشربها داخل منطقة الانتقال في حين تُحجَز الكريات الحمراء. ومن خلال القوى الشعرية، يُنقل المركب المُحلل إلى منطقة التفاعل لينتقي الأجسام المضادة النوعية المقترنة ويشكل معقداً بشكل شطيرة. بعد ذلك، في تفاعل نوعي تالٍ، يرتبط هذا المعقد بجسم مضاد ثانٍ ملون بالذهب، ليعطي في النهاية خطاً أحمر. أما التفاعلات الإيجابية الخاطئة فيتم استبعادها باستخدام الضوابط (controls). هذا التفاعل يكتمل خلال 15 دقيقة، بحيث يمكن مراقبته نوعياً بالفحص البصري، أو كمياً بواسطة آلة تصوير CCD، (charge coupled device).

أمثلة أخرى (Other examples). لقد أصبحت المعايرات المناعية مساعداً تشخيصياً مفتاحياً في الخدمات الطبية. ومع النمو المعرفي الهائل حول التنظيم الأيضي (metabolism) عند الإنسان، يتم سنوياً اكتشاف واسمات تشخيص جديدة للكشف المناعي المبكر عن الأمراض؛ إذ تستخدم المعايرات المناعية في التحليل الغذائي بطريقة سريعة وكمية للكشف عن إضافة بروتينات غير مسموح بها في الأغذية (مثلاً، إضافة الكازئين (casein) إلى السجق). كما يمكن بالتحليل المناعي تحري وجود الكائنات المجهرية الممرضة والسموم الجرثومية في الأغذية أو المياه بشكل سريع. إضافةً إلى ذلك، تسمح هذه التقانات بكشف الموادّ الغريبة (xenobiotics)، كمبيدات الأعشاب، بسهولة وبحساسية عالية (nM) في الأغذية أو المياه.



الأشكال العامة للمعايرة المناعية
1 غير منافسة، متجانسة
2 غير منافسة، متغايرة (شطيرة)
3 منافسة، متجانسة
4 منافسة، متغايرة
IP
R1
R2
A
مستضد مُخير
جسم مضاد
مركب الأنزيم الأولي (substrate)
مستضد ناشبة
منتج
إتحاد المُخير-الجسم المضاد
منتج وسيط = IP
قـراءة نتيـجة الـELISA
B/B0 [%]
تركيز الغلوبولين المناعي المُحلل
B/B0 %: قيمة التخامد والتي تمت معايرتها
أ: الخط المقارب العلوي
ب: التحدر في نقطة وسط الإختبار (الحساسية)
ج: نقطة وسط الاختبار (إمكانية الكشف)
د: الخط المقارب السفلي
طقـم كشـف الأزمـة القلـبية: التروبونين T
مدة التحليل: 15 دقيقة
إيجابي: خطين حمر
سلبي: خط أحمر
الآليـة
1 دم كامل تروبونين (TnT)
منطقة التفاعل
MAB2
MAB1
ذهب
نقل الذهب إلى منطقة التفاعل
2 مرشح ليفي-زجاجي تستبقي الكريات الحمراء
بلازما
TnT
3 ببتيد مصنع
ستربتافيدين
خط الضبط
خط الإشارة
حيز الكشف
يتحول دائماً خط الضبط إلى اللون الأحمر بينما لا يتحول خط الإشارة إلا إذا كان الـTnT موجوداً
حيز التطبيق
حيز التفاعل
حيز الكشف
MAB1 وMAB2= أجسام مضادة وحيدة النسيلة 1 و2

• المستشعرات الحيوية (Biosensors)

عموميات (General). يتم في الحساس الحيوي، ربط التعرف البيولوجي بواسطة أنزيم، أو جسم مضاد، أو DNA، أو كائن مجهري.. إلخ، مع محول طاقة (transducer) فيزيائي مثل قطب كهربائي (electrode) أو آلة ضوئية ليفية، أو بلّورة ضغطية[14] (Piezo). وعلى الرغم من البحوث المكثفة والمفاهيم العديدة، فإن قلة هي المستشعرات الحيوية التي نجحت تجارياً. يقع حجم سوق المستشعرات الحيوية بحيز الـ 2 بليون دولار أمريكي، حيث تسيطر عليه أنواع مختلفة من مستشعرات الغلوكوز.

المستشعرات الحيوية الكهركيميائية (electrochemical biosensors). لقد استخدمت في المستشعرات الحيوية الكهركيميائية أنزيمات الأوكسيداز (oxidase) أو الهيدرولاز (hydrolase). فمن خلال تحليل مركبها الأولي، تسبب أنزيمات الهيدرولاز تغيراً في الرقم الهيدروجيني (pH) الذي يمكن رصده بأقطاب كهربائية انتقائية للأيونات (ion-selective electrodes) (أي pH electrode) أو بالتأثير الحقلي للترانزيستورات (field-effect transistors). أما أنزيمات الأوكسيداز فتولد الهايدروجين بيروكسايد (H_2O_2) وتستهلك الأكسيجين (O_2)، في حين يمكن تحليل كلتا المادتين بقطب كهربائي لقياس الأمبير (amperometric electrode) كالقطب الكهربائي للأكسيجين. وبالتالي، من خلال استخدام ما يعرف بالوسائط (mediators) التي تنقل الإلكترونات إلى مجموعة الفلافين في الأوكسيداز، يمكن خفض إمكانية الأكسدة بشكل ملموس. فبالرغم من أن أكسدة الـ H_2O_2 تتطلب جهداً كهربائياً قدره 400mV + مقابل Ag/AgCl، فإن الداي ميثيل فيروسين (dimethylferrocene) يتأكسد عند جهد كهربائي قدره 100mV +، مزيلاً خطر تشكل إشارة إيجابية كاذبة إن وجد مثلاً حمض الأسكوربيك ـ L، (L-ascorbic acid) في العينة (ذات جهد كهربائي طبيعي 170mV + =ε). إن المثال الأكثر نجاحاً تجارياً لقطب كهربائي أنزيمي هو الحساس الحيوي للغلوكوز الذي يستخدم عادة في المستشفيات لتحديد قيمة الغلوكوز بسرعة، وهو يستخدم أساسياً بشكله المحمول من قبل مرضى داء السكري للاختبار الذاتي، كما يُستخدم أيضاً في مراقبة استهلاك الغلوكوز في المفاعلات الحيوية (bioreactors). إضافة إلى ذلك، هناك مستشعرات غلوكوز مصغرة قابلة للزرع عند مرضى داء السكري، إلا أنه يجب استبدالها خلال أيام قليلة بسبب عدم كفاية مواءمتها النسيجية، ما يجعلها غير مقبولة لضبط مضخة الإنسولين الآلية. من جهة أخرى، يمكن مراقبة تنفس الزرعة بشكل مستمر إذا ما تم تثبيت زرعة نقية أو مزيج كائنات مجهرية هوائية في أعلى القطب الكهربائي للأكسيجين. لقد تم تسويق هذا التصوّر في القياس المستمر لطلب الأكسيجين كيميائياً حيوياً (biochemical oxygen demand (BOD)) في مياه الفضلات مما أدى إلى الحصول على بيانات النتائج خلال دقائق عوضاً عن الأيام. كما يمكن أن تعتمد المعايرات المناعية الأنزيمية على تفاعلات تبليغ كهركيميائية عوضاً عن التفاعلات اللونية. إذ إن إدخال الـ DNA مع كواشف فعالة كهركيميائياً مثل الدونومايسين يسمح بالتحديد الكهركيميائي لأحداث التهجين. لكنه حتى الآن لم يصل أي من هذه التصوّرات إلى السوق.

المستشعرات الحيوية البصرية (Optical biosensors). إذا ارتبط الجسم المضاد مع المستضد، فإن كتلته تزداد بشكل يمكن ملاحظته من خلال تغير في خصائص سطح (الحقل المتخامد أسياً (evanescent field)) المحوِّل الضوئي (optical transducer). لقد وَجدت المعدات التي تقوم على هذا المبدأ قبولاً جيداً في سوق الأبحاث حيث إنها تسمح بتحديد حركية ارتباط الجسم المضاد بالمستضد بحساسية عالية (nM). بينما يعتمد مبدأ مستشعرات حيوية ضوئية أخرى على إخماد الفلورة (fluorescence quenching) بالأكسيجين أو بكيماويات عطرية متعددة الحلقات، مثل مشتقات الفينانترين (phenantrene)، ما يعطي إشارة نوعية (specific) بالمركب الأولي وذلك بوجود نظام الأوكسيداز الذي يستهلك كميات معادلة مولياً من الأكسيجين إثر أكسدة المركب الأولي.

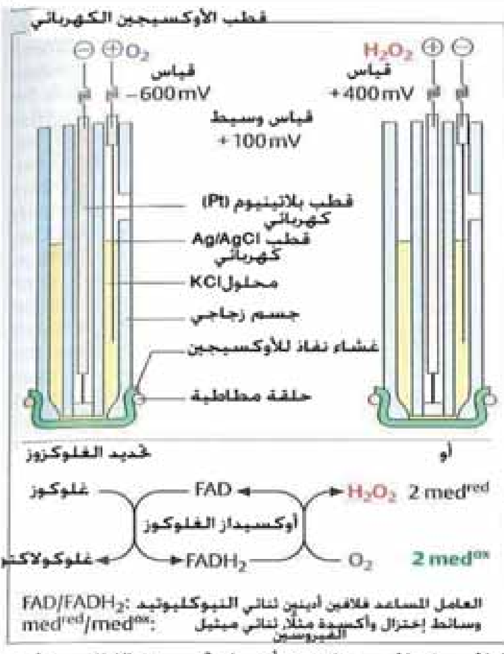
التحليل بالحقن الجرياني (Flow injection analysis (FIA)). بالرغم من عدم اعتبار هذه الطريقة حساساً حيوياً بالمعنى الدقيق (حيث تكون المكونات البيولوجية ومحولات الإشارة (transducers) عادة مفصولة عن بعضها البعض)، إلا أنها مفيدة للغاية في المعايرات الأنزيمية والمناعية ومعايرات الـ DNA. فهي تجمع التحليل مع المعالجة الآلية للسائل، مما يجعلها مفيدة في تطبيق معايرات متكررة لمركب مُحَلل واحد أو القليل من المركبات المُحَللة. وقد تم نقل مبدأ هذه الطريقة بنجاح إلى النظم الميكروية (microsystem) وحقول التقانة النانوية (nanotechnology).

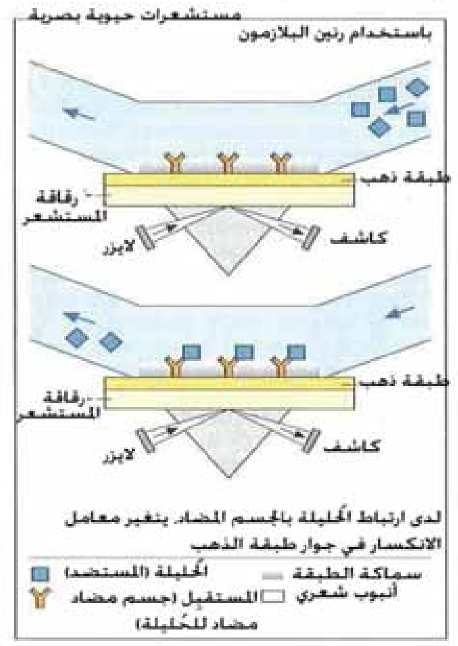
المستشعرات الحيوية الطبيعية (Natural biosensors). تمثل المستقبلات الكيميائية للبكتيريا وأعضاء الحواس لدى الحيوانات العليا أمثلة ذات أهمية في مجال المستشعرات الحيوية الطبيعية. هذه المستشعرات تستطيع تحليل مزيج عالي التعقيد من مواد كيماوية (مثلاً، عطر الورد، ونكهة النبيذ) بسرعة وكفاءة. وهناك محاكاة تقانية يتم تطبيقها على المستشعرات الحيوية الطبيعية عبر تحليل قياسي كيميائي (chemometric analysis) يعتمد على الشبكات العصبية. إلا أن نتائج دراسة هذه التقانة من أجل استخدامها في المستشعرات الحيوية، ما زالت حتى الآن بعيدة كل البعد عن أداء أنظمة الحواس الطبيعية.

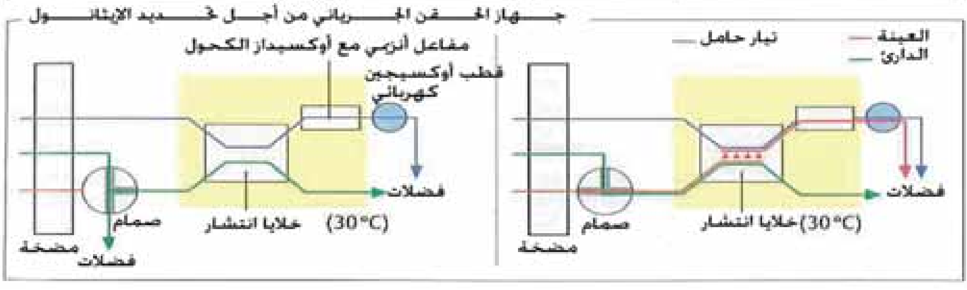
---

(14) عند حدوث فرق في ضغط البلورة تتولد إشارة غالباً كهربائية [إشارة كهرضغطية (Piezoelectric)].

المستشعرات الحيوية		
	المكون البيولوجي	محول الإشارة
أقطاب كهربائية أنزيمية قياس الأمبير قياس الجهد الكهربائي	 غالباً أوكسيداز غالباً هيدرولاز	 قطب الأوكسيجين الكهربائي قطب انتقاء أيوني كهربائي
أنزيم (الأثر الحقلي للترانزيستورات)	غالباً هيدرولاز	التأثير الحقلي للترانزيستورات
مستشعرات ميكروبية	كائنات مجهرية	قطب الأوكسيجين الكهربائي قطب انتقاء أيوني كهربائي
مستشعرات ضغطية	أجسام مضادة	بلورة كوارتز كهراضغطية (piezoelectric quartz crystal)
مستشعرات بصرية	أجسام مضادة، DNA	ألياف بصرية مع رنين البلازمون السطحي (surface plasmon resonance) أو وصلة لاختراق الحاجز
يتم غالباً تحضير العينة بمعالجة السائل. مثلاً، حالة التحليل بالحقن الجرياني (FIA)، حيث تكون معالجة الإشارة عادة إلكترونية، بينما يتم تحليل الإشارات المعقدة بالتعرف على النمط من خلال شبكة عصبية.		







■ التقانة الحيوية الزراعية

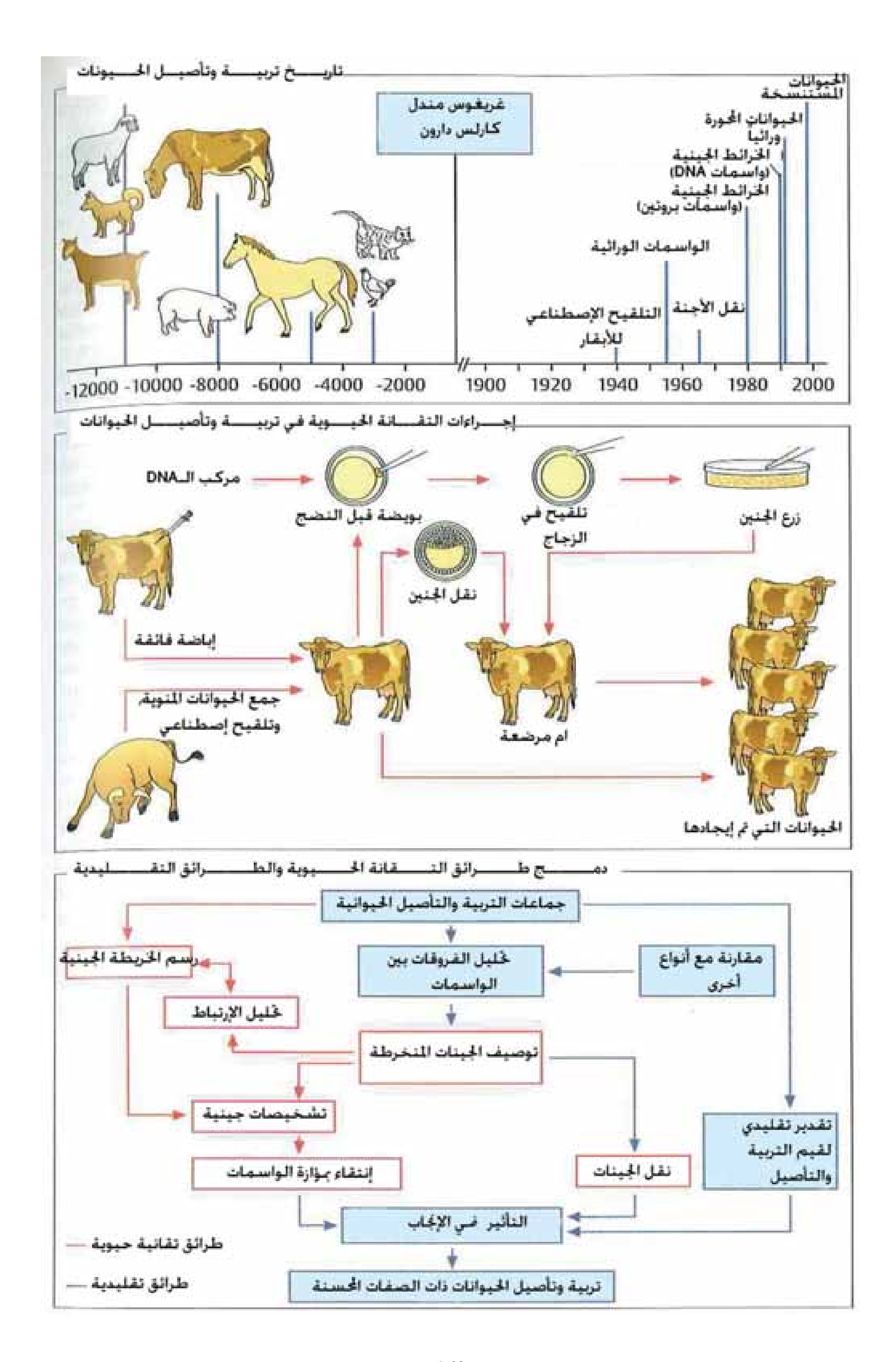
• تربية وتأصيل الحيوانات (Animal breeding)

عموميات (General). بدأ الإنسان منذ «الثورة الزراعية» في العصر الحجري الحديث، أي منذ قرابة 11000 سنة مضت، تدجين الكلاب والنعاج والماعز، وبعدها، منذ حوالى 8000 سنة تقريباً، قام بتدجين الأبقار والخنازير والأحصنة. في البداية، كان الترويض والتكاثر من الأهداف الأساسية لتربية الحيوانات. في حين تنطوي الأهداف الأكثر حداثة على تأمين منتجات حيوانية (لحم، حليب، بيض، صوف) بكميات ونوعيات أفضل. على سبيل المثال، يمكن أن يصل وزن العجول الحديثة المعدة للحم إلى أكثر من 300kg في السنة، وقد تنتج الأبقار الحلوب أكثر من 10000 ليتر حليب في السنة، إلا أن هذه الأرقام الدالة على الإنتاجية (الأداء) تمّت مضاعفتها خلال 30 عاماً فقط عن طريق برامج التربية والتأصيل. فمنذ عصور ما قبل التاريخ، اعتمد تزويج الحيوانات المنتخبة على معايير الأنماط الظاهرية (phenotypes) التي تعتمد على عوامل وراثية وبيئية. وبذلك، فإن الطرائق التقليدية في وراثة المجتمعات وتحاليل القياس الحيوية (biometric analysis) تتكامل أكثر وأكثر مع الطرائق الحديثة المستخدمة في بيولوجيا التكاثر والتشخيص الجيني. والأمثلة على ذلك هي: 1) التلقيح الصناعي؛ 2) التخصيب (التلقيح) في الزجاج ((in vitro fertilization (IVF) ونقل الأجنة؛ 3) تحضير الخرائط الجينية المتضمنة واسمات التربية والتأصيل؛ و4) تحديد النمط الوراثي (genotyping) للواسمات من أجل معرفة خصال عمل وأداء الحيوانات أو الأمراض التي قد تصيبها. أما بالنسبة إلى الحيوانات المحورة وراثياً والمكلونة (cloned) فقد استخدمت، حتى الآن، بشكلٍ أساسي في مجالات الأبحاث والإنتاج الصناعي.

التلقيح الاصطناعي ((Artificial insemination (AI)). قديماً ومنذ عام 1729، قام الطبيب الإيطالي لازارو سبالانزاني باستخدام التلقيح الاصطناعي لتربية وتأصيل الكلاب، كما كان في وقتٍ أبكر من ذلك، التلقيح الاصطناعي في البلدان العربية معروفاً في مجال تربية وتأصيل الخيول. أما عام 1942، فقد تم تأسيس أول موقع للتلقيح الاصطناعي في ألمانيا من أجل تربية وتأصيل الأبقار. إن التلقيح الاصطناعي غير مكلف، وهو يسمح بانتقاء ذكور الحيوانات التي تمتلك قيمة عالية في التربية والتأصيل. إذ يمكن الحصول من خلال قذفة واحدة للثور، على 400 حصة من المنايا (حيوانات منوية)، تحتوي كل منها على 20 مليون مني تقريباً بحيث يمكن تخزينها على حرارة 196°C. ومن أجل انتقاء الحيوانات المناسبة للتلقيح الاصطناعي، يتم البدء بعجول صغيرة، بحيث يجب أن تمر عبر خطوات غربلة متعددة تعتمد على مدى زيادة الوزن، وشكل الجسم، وإنتاج الحليب عند أمهاتهم. بعد ذلك تُزوّج «ثيران الاختبار» المنتقاة بعدد من الأبقار. وخلال فترة الاختبار يتم تقييم أداء انتاج الحليب واللحم في نسلها لمعرفة فيما إذا كان الثور المختار سيصبح «ثوراً منجباً في التربية والتأصيل»، وسيستبدل في النهاية آلاف الثيران في التزاوج التقليدي من أجل التربية والتأصيل، أم لا. يتم تلقيح الأبقار بحصة من المنايا المذابة بعد التجميد بواسطة بيطري، أو إخصائي التلقيح أو المؤصِّل. في أغلب البلدان الصناعية، تحمل أكثر من 80٪ من الأبقار بواسطة التلقيح الاصطناعي، وفي مجال تربية وتأصيل الخنازير، يُلقَّح حوالى 60٪ من إناث الخنازير بالتلقيح الاصطناعي.

التخصيب في الزجاج ونقل الأجنة (In-vitro fertilization (IVF) and embryo transfer (ET)): وتُطبَّق بشكل أساسي من أجل زيادة نسل الأبقار ذات الأداء العالي. في مجال نقل الأجنة (ET)، تُعالَج الأمهات بهرمونات مناسبة تؤدي لإباضة فائقة (superovulation)، بعد ذلك تتبع بتلقيح اصطناعي. ينتج من هذا الإجراء حوالى ثمانية أجنة مناسبة لعملية النقل (ET)، وأربعة عجول حية وسطياً بعد نقل هذه الأجنة إلى الأمهات المرضعات (fostering mothers). على الرغم من نضوج هذه العملية وإمكانية تطبيقها، إلا أنها معقدة وباهظة التكاليف، كما أنها غير مستخدمة على نطاق واسع في الزراعة. أما الطريقة الأخرى، فهي التخصيب بالزجاج (IVF) للبويضات خارج المجرى التناسلي، وهي طريقة مدروسة بشكل جيد، كما أنها تتطلب طرائق للزراعة وأيضاً ـ لأغراض أخرى عديدة ـ لحفظ الأجنة الناتجة. في الأبقار مثلاً، يتم الحصول على البيوضة بدون جراحة من خلال الموجات فوق الصوتية المعتمدة على تعليم الجريبات (follicle punctuation)، بينما هناك حاجة إلى العمل الجراحي في حيوانات أخرى (كالنعاج والخنازير). في هذه الطريقة، يمكن تحديد جنس الأجنة بواسطة تفاعل البوليمراز التسلسلي (PCR) وذلك خلال 3 ـ 6 ساعات. في النهاية، تُعرض الأجنة المفروزة جنسياً على المربين المهتمين لنقلها إلى الأمهات المرضعات.

الخرائط الوراثية (Genetic maps). تم خلال السنوات العشر الأخيرة إنشاء خرائط وراثية مفصلة للحيوانات البيتية، وخاصةً فيما يتعلق بالجينات التي تؤثر في صفات الأداء (performance traits). يمكن تحليل المتغيرات الجينية باستخدام طرائق تفاعل البوليمراز التسلسلي (PCR) وطول شدفة الحصر الناتجة من تعدد أشكال الجينات (restriction fragment length polymorphism (RFLP)). من الأمثلة ذات العلاقة؛ جين مستقبل الـ ryanodine عند الخنزير، التي تؤثر طفرته بشكلٍ كبير في تحمل الإجهاد؛ ومختلف الجينات المُشفرة التي تؤثر في عطاء الحليب ونوعيته عند الأبقار. هكذا، فإن غالبية الصفات المتعلقة بالأداء تخضع لتأثير عدد كبير من الجينات، وبالتالي يتطلب تحليلهم وتطبيقهم في التشخيص الوراثي مزيداً من الجهود.



تاريخ تربية وتأصيل الحيونات
غريغوس مندل
كارلس دارون
الحيوانات المستنسخة
الحيوانات المحورة وراثيا
الخرائط الجينية (واسمات DNA)
الخرائط الجينية (واسمات بروتين)
الواسمات الوراثية
نقل الأجنة
التلقيح الإصطناعي للأبقار
-12000 -10000 -8000 -6000 -4000 -2000
1900 1920 1940 1960 1980 2000
إجراءات التقانة الحيوية في تربية وتأصيل الحيوانات
مركب الـDNA
بويضة قبل النضج
تلقيح في الزجاج
زرع الجنين
نقل الجنين
إباضة فائقة
جمع الحيوانات المنوية وتلقيح إصطناعي
ام مرضعة
الحيوانات التي تم إيجادها
دمج طرائق التقانة الحيوية والطرائق التقليدية
جماعات التربية والتأصيل الحيوانية
رسم الخريطة الجينية
تحليل الفروقات بين الواسمات
مقارنة مع أنواع أخرى
تحليل الإرتباط
توصيف الجينات المنخرطة
تشخيصات جينية
تقدير تقليدي لقيم التربية والتأصيل
إنتقاء بموازة الواسمات
نقل الجينات
التأثير في الإنجاب
طرائق تقانية حيوية
طرائق تقليدية
تربية وتأصيل الحيوانات ذات الصفات المحسنة

• نقل الأجنة، والحيوانات المكَلوَنة (المستنسخة)
(Embryo transfer, cloned animals)

عموميات (General). يضم هذا الفصل طرائق الإباضة الفائقة (superovulation)، وعمليات زراعة الأجنة ونقلها إلى الأمهات المرضعات. بالإضافة إلى الإشارة إلى الأجنّة المعدلة وراثياً (transgenic embryos) وإنتاج الحيوانات المكلونة (cloned animals).

التطور الجنيني عند الثديات (Embryonic development in mammals). تتحرر البويضة عند أغلب الثديات من المبيض خلال الطور التالي (metaphase) من الانقسام المنصّف الثاني (بويضة ثانوية). في حالة حدوث التخصيب بالحيوان المنوي، يستمر الانقسام المنصّف ويتحرر الجسم القطبي (polar body) الثاني. بعد ذلك، تتحد النواتان الأوليان الأحاديتا الصيغة الصبغية (haploid prenuclei) الناشئتان من البويضة ومن الحيوان المنوي لتشكلا النواة الثنائية الصيغة الصبغية (diploid) المسماة بالزيجوت (zygote)، الذي يبدأ عملية الانقسام الخلوي الأول. يتناقص خلال الانقسامات اللاحقة، حتى مرحلة التويتة (morula)، حجم النواة بشكل مستمر، في وقتٍ تشهد مرحلة التويتة أول تمايز خلوي الذي يقود إلى كيسة أريمية (blastocyst) تنغرس بعد انحلال منطقة الباحة الصافِية (zona pellucida) في الغشاء المخاطي للرحم من أجل تكون الجنين.

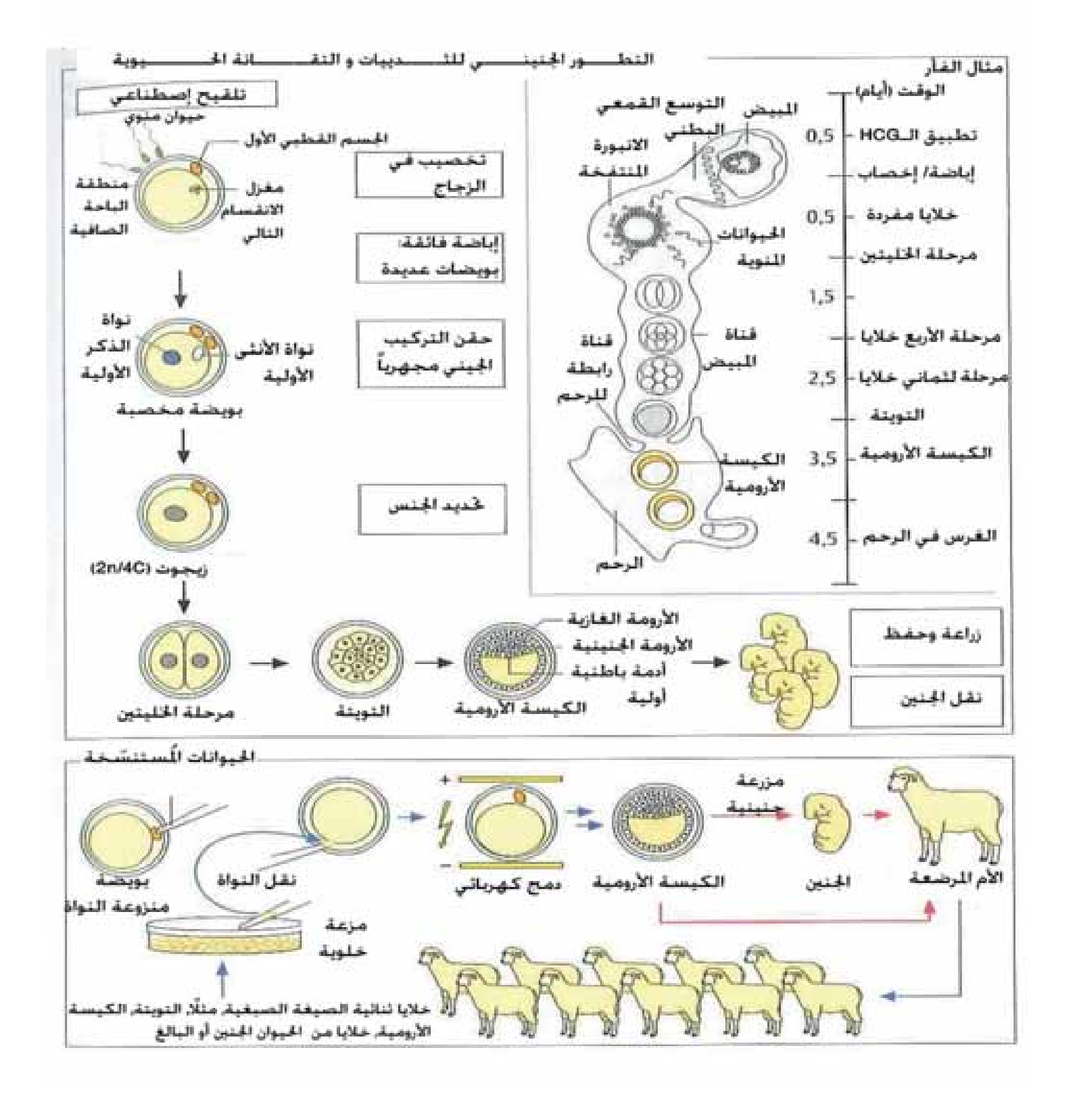
الإباضة الفائقة وزراعة الأجنة (Superovulation and embryo cultivation). يمكن زيادة احتمال إنتاج البويضات (تحقيق إباضة فائقة (supperovulation)) عند أغلب أنواع الثديات، وذلك عن طريق معالجة الأمهات بالهرمونات. كما أنه غالباً ما يكون ممكناً الحصول على بويضات، والقيام بتخصيبها في الزجاج (IVF) ثم تطويرهم في بيئة صناعية خارج الجسم (ex vivo) حتى مرحلة الجنين باستخدام أوساط مغذية مناسبة. لقد أجريت معظم التجارب على أجنة الأبقار والنعاج لأسباب اقتصادية، حيث يمكن حفظها إلى ما لا نهاية على حرارة ـ 196°C (الحفظ بالتجميد (cryopresevation)).

نقل الأجنة وفصل الأجنة (Embryo transfer (ET) and embryo splitting). يُعّرف نقل الأجنة (ET) بأنه عملية نقل لأجنة غريبة إلى أم مرضعة (foster mother) من ذات النوع. يمكن أن تنشأ هذه الأجنة من حيوانات متبرعة محفَّزة الإباضة بشكلٍ فائق (superovulate) جرى تلقيحها اصطناعياً. هذه العمليةً تختلف عن استنساخ (كلونة) الأجنة التي يتم فيها عزل القُسَيْمات الأرومية (blastomers) بالجراحة المجهرية من تويتة (morula) واحدة؛ بحيث تُزرع كل مجموعة من هذه القُسَيْمات في الزجاج (in vitro) حتى مرحلة الكيسة الأريمية (blastocyst) الكاملة، ثم بعد نقلها للأم المرضعة يمكن أن تتطور هذه القُسَيْمات الأرومية إلى حيوانات متطابقة وراثياً. باستخدام مثل هذا الإجراء، يمكن الحصول عادة على اثنين، وأحياناً على 6ـ 20 جنيناً قابلاً للنقل من بقرة واحدة، حيث إن 50٪ تقريباً منها سوف يتطور إلى عجول أصحاء. هذه الطريقة هي ممارسة بشكلٍ واسع.

الأجنة المعدلة وراثياً (Transgenic embryos). يمكن خلال مرحلة البويضة (oocyte) أو الكيسة الأريمية (blastocyst) من التطور الجنيني، إدخال البناء الجيني المرغوب بواسطة الحقن المجهري (microinjection) إلى نوى أولية (prenuclei) أو إلى خلايا جذعية جنينية (embryonic stem cells). فبهذه الطريقة يمكن إدخال مادة وراثية جديدة إلى الجنين المستقبل، ثم بعد ذلك يمكن نقل الأجنة المعدلة وراثياً هذه إلى أمهات مرضعات (foster mothers)، التي ستحوي هذا الجنين حتى ينمو وتلد في النهاية حيواناً معدلاً وراثياً. لقد أجريت الدراسات الرائدة في هذا المجال على الفئران لكونها حيوانات تجارب مخبرية هامة في الأبحاث الأساسية والتطبيقية. كما يمكن تطبيقها أيضاً على حيوانات المزارع. فقد اعتُبرت هذه الطريقة مسألة مفتاحية في «الزراعة الجينية» (gene farming).

الحيوانات المستنسخة (المكلونة) (Cloned animals). إن التكاثر اللاجنسي (asexual reproduction) الذي يقود إلى كلونات (أنسال) متطابقة، هو منتشرٌ جداً عند الكائنات وحيدة الخلية (unicellular organisms)، والنباتات، والحيوانات الدنيا. أما في الحيوانات العليا فهي قليلة جداً، إذ تبلغ وتيرة التوائم المتطابقة عند الإنسان مثلاً، 0,3٪ فقط. لهذا الغرض، أي من أجل توليد كلونات تجريبية متطابقة عند الحيوانات العليا، يتم أخذ بويضة (أحادية الصيغة الصبغية) من أنثى واهبة (معطية)، بحيث تُنزع نواتها بواسطة ماصة دقيقة (micropipette). بعد ذلك، يحفَّز الطور الخلوي G_0 عندما لا يكون هناك انقسام خلوي (في خلية جسمية (المأخوذة من زرعة خلوية لظهارة ضرع (udder epithelium)) لذات النوع الحيواني، ويتم دمجها (هذه الخلية ذات النواة ثنائية الصيغة الصبغية) مع البويضة منزوعة النواة. وبالنتيجة، تتطور الخلايا ثنائية الصيغة الصبغية الناتجة إلى المرحلة الجنينية إما في الزرعة الخلوية أو في قناة المبيض لأنثى عقيمة، ليتم نقلها لاحقاً إلى أم مرضعة (foster mother). في عام 1997، ولأول مرة في تاريخ البشرية، تم توليد أول حيوان مطابق وراثياً لأمه معتمداً على الخلايا الجسمية المتمايزة (النعجة دوللي Dolly)). لقد كان هذا النجاح الوحيد لنعجة مطورة ضمن تجربة تضمنت 277 بيضة منزوعة النواة، و27 جنيناً مشتقاً منها. وعلى الرغم من هذه الإحباطات المخبرية، تم نقل هذه الطريقة وتطبيقها على الفئران، والماعز، والخنازير، والأبقار بالإضافة إلى أنواع أخرى. تستخدم هذه الطريقة بشكل أساسي لتوليد قطعان معدلة وراثياً أحادية النسيلة، مثلاً، بغية إنتاج بروتينات علاجية في الحليب الذي تنتجه هذه الحيوانات (الزراعة الجينية (gene farming)).

الهرمونات المتحكمة بالدورة الأنثوية عند الثديات		
الهرمون	**العزل**	**التأثير**
البروستاغلاندين (PGF24)	التصنيع الكيميائي	تحطم الـ *Corpus luteum* وتحرر الحرارة الجنسية
هرمون تنشيط الجراب (FSH)	غدة الخنازير النخامية أو بروتين مأشوب	يقود تنشيط الجريب إلى الإباضة الفائقة
غونادوتروبين مصل الفرس الحامل(*PMSG)	من مصل الفرس الحامل	يقود تنشيط الجريب إلى حدوث الوطأة العظمى والإباضة الفائقة.
هرمون تحرير الغونادتروبين (GnRH)	التصنيع الكيميائي	يحرض على الإباضة

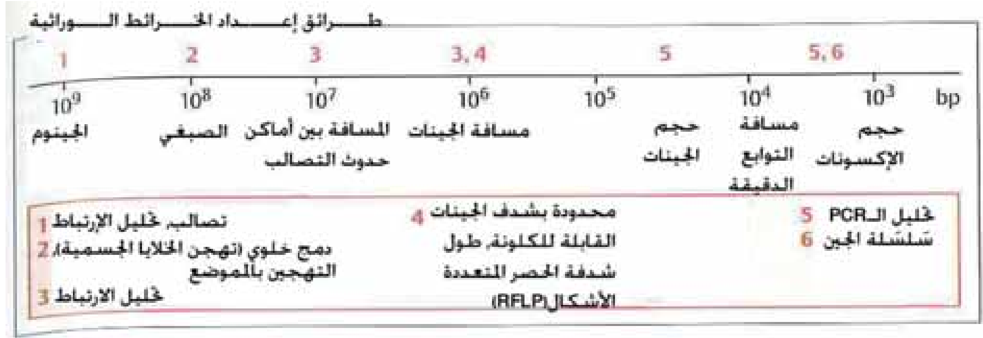


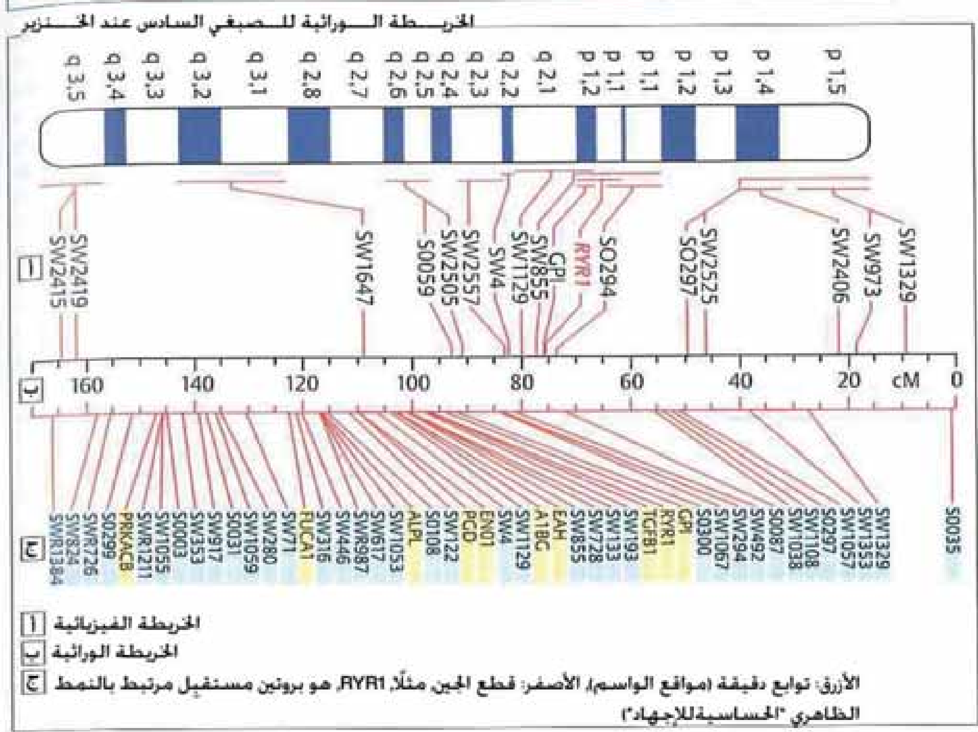
● الخرائط الجينية (Gene maps)

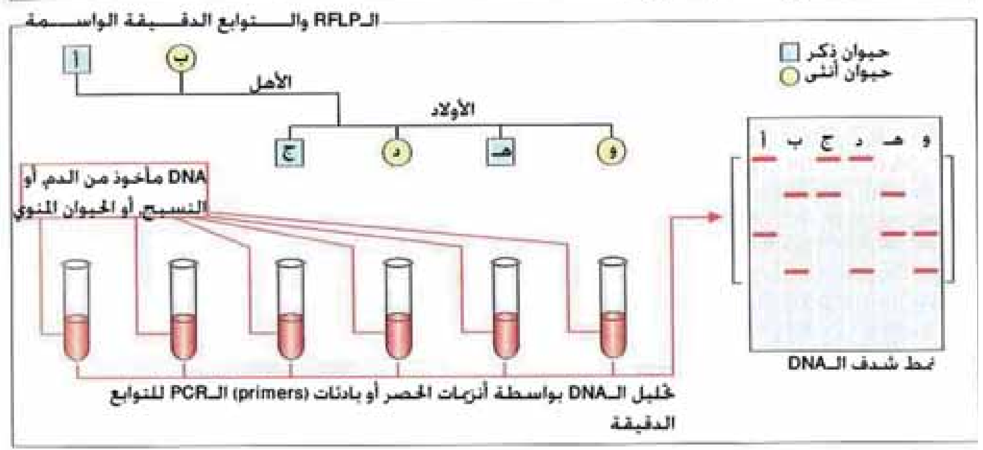
عـمـومـيـات (General). اعـتـمـدت تـربـيـة (breeding) الحيوانات خلال السنوات المئة الأخيرة على الانتقاء والتزاوج. كما تم تطوير طرائق إحصائية من أجل تحليل العوامل البيئية والوراثية المؤثرة في النمط الظاهري للحيوانات. فقد جرى تطوير خرائط وراثية متزايدة الدقة للحيوانات البيتية الهامة (الحصان، الأبقار، الخنازير، النعاج، الماعز، الدجاج، الكلاب، القطط) تعتمد على ارتباط الصفات الوراثية (genetic traits) أو الواسمات (markers)، في حين تقوم الخرائط الفيزيائية بتحديد مواقع الجينات على DNA الصبغيات المنفردة. يبلغ حجم التركيب الوراثي ـ جينوم ـ (genomes) للحيوانات البيتية حوالى 3Gbp مع تعقيد مشابه لجينوم الإنسان. حتى الآن، تمت سَلسلة جينوم بعض الأنواع النموذجية من الحيوانات كالفأر، والذبابة والدودة C. elegans بشكل كامل. علاوة على ذلك، تتوافر بالنسبة إلى الدجاج، والأبقار والخنازير خرائط ازدواجية جينومية شاملة (genome-wide coupling maps) تضم في كل نوع عدة آلاف من مواقع توابع الـ DNA الدقيقة (microsatellite) كواسمات، وعدة مئات من الجينات ذات وظيفة معروفة ومحددة. وهكذا، باستخدام هذه المعطيات يمكن تنميط أشكال الأليلات (alleles) لهذه الجينات بواسطة طرائق تفاعل البوليمراز التسلسلي (PCR)، حيث يمكن أن ترتبط هذه الأشكال الوراثية بصفات الأداء، وتستخدم بالتالي في برامج التربية والتأصيل.

التحسينات الوراثية (Genetic improvement) تتشابه مهمة ربط الصفات المرغوبة (مثلاً، الإنتاج العالي من الحليب) بمورثاتها (جيناتها) مع مهمة تجميع أحجية مؤلفة من عشرات الألوف من القطع المتشابهة جداً، لكنها متنوعة المنشأ (أباء وذرية). ولتبسيط عملية التحليل الوراثي، يجب أولاً مقايسة (standardize) العوامل البيئية المؤثرة في تطوير الصفة (trait) المدروسة. ففي ممارسات التربية والتأصيل (breeding)، يمكن تقدير تأثير العوامل الوراثية مقابل العوامل البيئية في تغيير قيمة الصفة بواسطة طرائق إحصائية معقدة (مثل برنامج (Blup (best liner unbased prediction). كما أصبح من الممكن مع تقنيات مثل التلقيح الاصطناعي (artificial insemination) ونقل الأجنة (embryos transfer)، الحصول على مجموعات من الحيوانات البيتية، التي ينشأ نصف محتواها من الجينات من أصل (parent) واحد، مما يسمح بإجراء تحاليل أكثر دقة على الأصل (المنشأ) الوراثي للصفات في النسل (الذرية). إلا أنه في النهاية، لا تسمح أي من هذه الطرق بتحليل تأثير تعدد أشكال الجينات المستقلة (individual gene polymorphisms) في الصفات المعقدة.

خرائط الجينوم وسَلسَلتِهِ (Genome maps and genome sequencing). بما أن جينومات (التركيب الوراثي) أغلب الحيوانات البيتية تتكون من ما يقارب ثلاثة بلايين زوج قاعدي (3Gbp)، وعملية سَلسلة الـ DNA المباشرة هي محدودة بحوالى ستمئة زوج قاعدي (bp600) في المعايرة الواحدة، فقد كان من الضروري استخدام إجراءات معقدة لتحديد مواقع الجينات المستقلة. كما يعتبر تحديد تسلسلات واسم الـ DNA المتعدد الأشكال (polymorphic) في الـ DNA الأبوي (أي أنه مؤلف من عدة أليلات (alleles)) ومتابعة توريث الصفات الوراثية في أجيال النسل من الأمور المفتاحية الهامة. من أهم الواسمات المستخدمة لهذا الغرض هي التوابع الدقيقة (microsatellite)، فهي تمتلك أعداداً مختلفة من الإعادات العشوائية ((variable numbers of tendem repeats (VNTR))، كما أنها تتواجد بشكل متكرر في جينوم الثديات (حوالى 50 ألف إلى 100 ألف موقع للتوابع الدقيقة في الجينوم الواحد). أما الطريقة الثانية المستخدمة في تحليل مواقع واسمات الـ DNA، فهي التحليل بالـ RFLP (طول شدفة الحصر المتعددة الأشكال). في هذه الطريقة، يتم هضم الـ DNA الأبوي وDNA الذرية بواسطة أنزيمات الاقتطاع الداخلية (endonucleases) لتتم مقارنة أنماط الشدف (fragments) الناتجة بواسطة الهجرة الكهربائية على الهلام. تقود هذه الطريقة إلى خرائط لأشكال الـ DNA المتعددة (polymorphisms)، مرتبطة، في الحالات المثلى، بقيم صفات الأداء، مما يجعلها مفيدة في برامج التربية والتأصيل (breeding). وعند تحديد موقع متعدد الأشكال (polymorphism)، الهام في التربية والتأصيل، على الجينوم، يصبح بالإمكان تضخيمه بواسطة تفاعل البوليمراز التسلسلي (PCR) وتحديد تسلسله باستخدام منتج هذا التفاعل. إلا أنه، يجب توخي الحذر لناحية تأمين معلومات كافية عن الإكسون (exon) والإنترون (intron) المشكلين للجين المستهدف، خاصةً عن طريق تحليل الـ RNA الرسول المنسوخ (mRNA) أو الـ DNA المتمم (cDNA) المشتق منه. تتوفر خرائط جينية للعديد من الحيوانات البيتية المهمة اقتصادياً كالدجاج، والأبقار والخنازير. وقد تم الحصول عليها بملاحظة توريث الصفات، الجينات وواسمات الـ DNA . كما يؤمن تحليل الارتباط (linkage analysis) معلومات إضافية عن مواقع الجينات والواسمات بالنسبة إلى بعضها البعض على DNA الصبغي، حيث يتم تسجيل حدوث التأشيب خلال التصالب في الانقسام المنصّف (meiotic crossing over) بطريقة التحليل هذه (تحليل الارتباط).


طـرائق إعـداد الخـرائط الـوراثية
1
2
3
3, 4
5
5, 6
bp
الجينوم
الصبغي
المسافة بين أماكن حدوث التصالب
مسافة الجينات
حجم الجينات
مسافة التوابع الدقيقة
حجم الإكسونات
1 تصالب، تحليل الإرتباط
2 دمج خلوي (تهجن الخلايا الجسمية)، التهجين بالموضع
3 تحليل الارتباط
4 محدودة بشدف الجينات القابلة للكلونة، طول شدفة الحصر المتعددة الأشكال (RFLP)
5 تحليل الـ PCR
6 سلسلة الجين


الخريـطة الـوراثية للـصبغي السادس عند الخـنزير
q 3,5
q 3,4
q 3,3
q 3,2
q 3,1
q 2,8
q 2,7
q 2,6
q 2,5
q 2,4
q 2,3
q 2,2
q 2,1
p 1,2
p 1,1
p 1,1
p 1,2
p 1,3
p 1,4
p 1,5
SW2419
SW2415
SW1647
S0059
SW2505
SW2557
SW4
SW1129
SW855
GPI
RYR1
SO294
SO297
SW2525
SW2406
SW973
SW1329
cM
S0035
SW1384
SW824
SWR726
S0299
PRKACB
SWR1211
SW1055
S0003
SW353
SW917
S0031
SW1059
SW280
SW71
FUCA1
SW316
SW446
SWR987
SW617
SW1053
ALPL
S0108
SW122
PGD
ENO1
SW4
SW1129
A1BG
EAH
SW855
SW728
SW133
SW193
TGFB1
RYR1
GPI
S0300
SW1067
SW294
SW492
S0087
SW1108
SW1038
S0297
SW1057
SW1353
SW1329
1 الخريطة الفيزيائية
ب الخريطة الوراثية
ج الأزرق: توابع دقيقة (مواقع الواسم)، الأصفر: قطع الجين، مثلًا، RYR1، هو بروتين مستقبل مرتبط بالنمط الظاهري "الحساسية للإجهاد"


الـ RFLP والـتوابع الدقـيقة الواسـمة
حيوان ذكر
حيوان أنثى
الأهل
الأولاد
DNA مأخوذ من الدم، أو النسيج، أو الحيوان المنوي
تحليل الـ DNA بواسطة أنزيمات الحصر أو بادئات (primers) الـ PCR للتوابع الدقيقة
نمط شدف الـ DNA

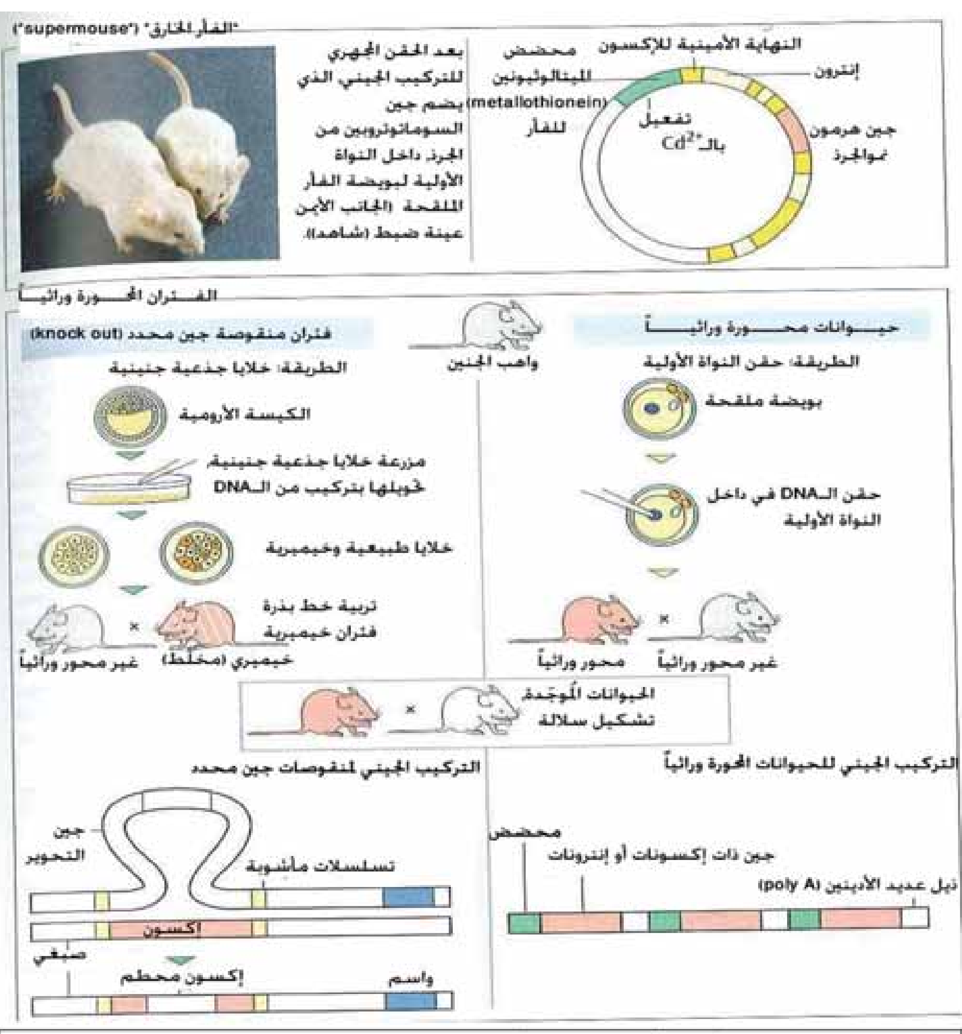
● الحيوانات المحوّرة وراثياً (Transgenic animals)

عموميات (General). تلعب الحيوانات المحوّرة وراثياً، التي تعبر عن جينات غريبة (مضاف إليها جين محدد (knock-in) أو تفتقد التعبير عن جينات داخلية المنشأ (indigenous genes) (منقوصة جين محدد (knockout))، دوراً هاماً في كل من؛ البحوث الأساسية التي تستخدم نماذج حيوانية لعلاج أمراض الإنسان، تربية وتأصيل الحيوانات. ويعتبر الفأر (Mus musculus، صفة: فأري murine) من أهم النماذج الحيوانية نتيجة لقربه الفيزيولوجي (الوظيفي) من فزيولوجيا الإنسان وتربيته وتأصيله البسيط.

الحيوانات المحورة وراثياً (Transgenic animals). لتقليل الأثار الجانبية الناجمة عن الأنماط الوراثية متغايرة اللواقح (heterozygous genotypes)، تشتق الحيوانات المحورة وراثياً بشكل تفضيلي من سلالات أبوية مرباة ومؤصلة داخلياً (inbred). عند الفئران، أدت التربية الداخلية (التوالد الداخلي) بين الإخوة والأخوات حتى 7 ـ 10 أجيال إلى مجتمعات متماثلة اللواقح بشكل كبير. أما في إجراءات التحوير الوراثي للحيوانات، فغالباً ما تُستَخدم طريقة الحقن المجهري (microinjection) للتركيبات الجينية داخل الخلايا الجذعية الجنينية (ES) أولية النواة لنقل المادة الوراثية الغريبة. ومع كون هذه الطريقة سريعة، إلا أن عدداً قليلاً من الأجنة ينجو من هذه المعالجة ويبقى حياً. وبالنسبة إلى النواقل (vectors) المناسبة التي يتم إدخالها فتحتوي عادة على التركيب الجيني في شكل بنية من الإنترونات (introns) والإكسونات (exons)، بالإضافة إلى محرّض (promoter) وتسلسل إشارة متعدد الأدينين (polyA signal)، بحيث ينفذ غالباً تأشيب هذا التسلسل ضمن جينوم الحيوان المستقبل بنسخ متعددة وفي أماكن مختلفة بشكل متزامن. ولما كان هذا غير مرغوب فيه في تجارب تعطيل جين محدد (knockout) فإن تعداء (transfection) الخلايا الجذعية الجنينية في الزجاج هو المفضل. في هذا الإجراء يتم استخدام نواقل الإقحام (insertion vectors) التي تحتوي على امتدادات من الـ DNA المتجانس مع الجين المراد استبداله، لكنها تفتقد التسلسلات المهمة في الإشفار عن الجين الفعال. يحدث التأشيب بتحفيز كسر الجديلة المضاعفة (double strand break) أو بالتصالب (crossing over) مما يفضي إلى تعطيل الجين الفعال. وتسهل التحكم بهذه التجارب واسمات الانتقاء (selection makers) أو مصائد الجينات (gene traps)، حيث تتم كلونة الجين المُخبِر (reporter gene) ضمن إكسون أو تسلسلات منظمة (regulatory sequences) في الجين المستهدف. باستخدام مثل هذه البروتوكولات المستهدِفة للجين، يمكن انتقاء الخلايا المستقبلة التي تحتوي على نسخة واحدة من الجين الموجودة ضمن موقع واحد معروف جيداً من تسلسل الـ DNA. أما بغية إسكات الجينات، فتُستعمَل بكثافة أنواع مختلفة من تراكيب الـ RNA المتداخل أو المضاد للتعبير، في حين يستخدم النسل (الذرية) الحاوي على الجينات المؤشَّبة حديثاً أو التي تم إسكاتها في بعض الخلايا الجنسية (بذرة الحيوانات الخيميرية) في المزيد من تربية وتأصيل الحيوانات المحوّرة وراثياً المتجانسة اللواقح (الحيوانات الموجِدة).

الفئران المحورة وراثياً (Transgenic mice). تحفز الإباضة الفائقة في الإناث المرباة (المتوالدة) داخلياً (inbred) بحقن هورمون الغونادوتروبين داخل الغشاء البيريتوني، بعد ذلك يتم تحبيلها بالتزاوج. يمكن الحصول من قناة البيضية لديهم على خلايا في مراحل متعددة، مثلاً خلايا في مرحلة التويتة أو خلايا في مرحلة الكيسة الأريمية، وذلك اعتماداً على الوقت الذي يتم فيه التحضير. هذه الخلايا يمكن تحويلها عن طريق التعداء أو الحقن المجهري. في التعداء، تحضر الخلايا الجذعية الجنينية (ES) المتعددة القدرات من الكيسة الأريمية ويتم إكثارها في زرعة نسيجية. بعد ذلك، يمكن تحويل الخلايا الناتجة بواسطة نواقل DNA مناسبة وإعادة حقنها بالكيسة الأريمية، مما ينتهي إلى ما يعرف بالأجنة المعدلة وراثياً. أما في الحقن المجهري، فيتم حقن ناقل مناسب يحتوي على DNA غريب في النواة الأولية الذكرية الأكبر حجماً (بحيث تظهر في البويضة بعد الإخصاب). في النهاية، وفي كلتا الطريقتين، تُغرس الكيسة الأريمية المحورة أو البويضة في جدار رحم أم مرضعة جُعلت حاملاً بشكل زائف عن طريق الاقتران بذكر فأر مستأصل الأسهر (vasectomized).

تطبيقات (Application). جرى في عام 1982 ولأول مرة حقن تركيب جيني يُشفر لهرمون نمو الجرذ مجهرياً في النواة الأولية (prenucleus) لبويضة فأر مخصبة، بحيث تم تطويرها داخل أم مرضعة إلى «super - mouse» محور وراثياً. باستخدام مثل هذا النوع من التقنيات، يمكن تحليل جينات محددة ذات دور في الأمراض الوراثية. وبالتالي، قد يتأتى عن طريق تجارب إزالة الجين، دليل تجريبي على احتمالية تورط هذا الجين في الحالة المرضية. ففي فأر الأورام (oncomouse)، تم قرن الجين الورمي v-Ha-ras (oncogene) المفعل إلى محضض (promoter) جنيني يعمل على تشكيل أورام جلدية عند حدوث جرح بالبشرة، مما يساعد على استخدام الفأر الورمي في الإختبارات الجلدية للمطفرات (mutagens). كما تنفع الفئران المحورة وراثياً والمطفرة في جين البروتين السالف للبيتا أميلويد (amyloid precursor protein (APP)) كحيوان نموذجي لدراسة مرض الأزهايمر، أو مرض العَوَز المناعي المشْتَرَك الوَخيم (SCID) severe combined immunodeficiency) كمثال على الأمراض المناعية. مع نهاية عام 2002، سوف يكون أكثر من 800 سلالة فأرية محورة وراثياً متاحة تجارياً. كما أنه مع نهاية تحديد التسلسل الجينومي للعديد من السلالات الفأرية، سيكون تحليل الفئران المعدلة وراثياً أداة قيمة في التحليل الوظيفي للجينوم البشري.



سلالات الفئران المستخدمة في الأبحاث السريرية	
التغييرات/ الإعاقات	**التطبيقات**
التربية التقليدية	فئران عديمة الشعر أو عارية لاختبارات مواءمة الجلد
التعبير عن السوماتوتروبين الجرذي	"الفأر الخارق" ("supermouse")
الجهاز المناعي القاصر	الفأر المصاب بالعَوَز المناعي المشْتَرَك الوخيم: نقص المناعة
بروتين كبح الورم P53 القاصر	الفئران الورمية: توليد السرطان
قصور في تكوّن الأوعية الدموية	الفئران عالية الضغط
خلل الـCTFR (cystic fibrosis)	فئران التليف المثاني (لتجارب العلاج الجيني)
حتى أواخر 2002، تم الكشف عن أكثر من 800 نوع من الفئران المعدلة وراثياً، وأصبح العديد منها متاحاً تجارياً	

• زراعة الجينات والزرع الغريب

(Gene farming and xenotransplantation)

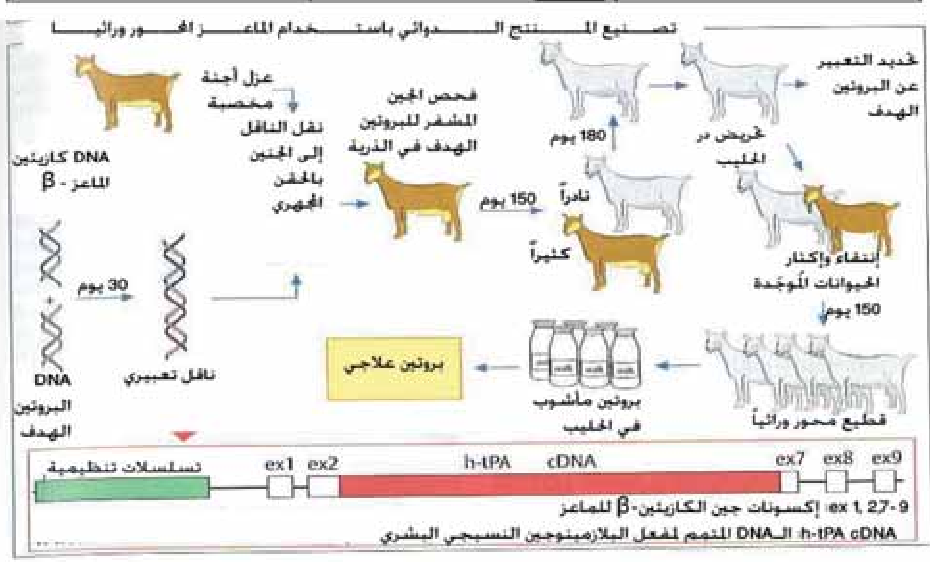
عموميات (General) . ضمن سياق الإنتاج الحيواني المحسن، تمثل الأبقار المعدلة وراثياً (حليب، لحم)، والخنازير (لحم)، والدجاج (لحم، بيض)، والسمك (لحم) هدفاً هاماً للاستقصاء الواسع. كما تجري الآن دراسة الأحصنة (أداء السباق) والكلاب أيضاً. ونتيجة لهذه التكنولوجيا المتطلبة وجدل العامة، استخدمت الحيوانات المحورة وراثياً في بعض النواحي فقط. على سبيل المثال، تمّت هندسة الماعز، والنعاج والأبقار لإنتاج البروتينات القيمة دوائياً في حليبها (**الزراعة الجينية**). وعلى نحو مشابه بالتقنيات المرتبطة بالنباتات المحورة وراثياً، غالباً ما تكون العطاءات (yields) مرتفعة ومنافسة بشكل مفاجئ للإجراءات المستخدم فيها حيوانات مأشوبة (recombinant) أو خلايا حيوانية أو ميكروبية في المفاعل الحيوي (bioreactor) . في حين تعتبر الخنازير المحورة وراثياً مؤونة هامة لاستبدال الأعضاء عند الإنسان (الزراعة الغريبة)، خصوصاً في مجال زراعة القلب.

تربية وتأصيل الحيوانات المحورة وراثياً (Breeding of transgenic animals) . وقد ركزت في البداية على زيادة النمو عن طريق نقل الجينات التي تؤدي إلى زيادة الإنتاج الذاتي (endogenous production) من هرمون النمو (السوماتوتروبين (somatotropin)) . أما حديثاً، فهناك اهتمام وتركيز كبير على أهداف أخرى، مثل المقاومة المعززة ضد الأمراض والإجهادات، وكذلك تحسين نوعية البيض أو اللحم عند الثديات. ففي الثديات، تم نقل الجين بواسطة الحقن المجهري (microinjection) داخل بويضة مخصبة أولية النوى (pronuclei)، ومن ثم نقل للجنين (embryo transfer) . كما جرى تحوير الدجاج باستخدام الفيروسات القهقرية (retroviruses) المأشوبة، وكذلك عن طريق التخصيب بواسطة نطفة مؤشبة. إضافةً إلى تحوير الأسماك بالتثقيب الكهربائي (electroporation) للبويضات وإدخال الـ DNA . وكمثال على تطبيق هذه التقنيات؛ ما جرى من تحسين مقاومة البرد لدى السمك بواسطة كلونة البروتين المضاد للتجمد.

الزراعة الجينية (Gene pharming) . إن البروتينات الهامة طبياً يمكن إفرازها في حليب الحيوانات المحورة وراثياً. من أجل ذلك، غالباً ما يتم كلونة الجين المرغوب خلف محث الكازئين S1 ألفا أو بيتا (β-or α S1- casein promoter)، ثم يُحقن البناء الجيني المناسب في بويضة مخصبة أولية النواة (prenucleus) للحصول في النهاية على جنين محور وراثياً. وعلى الرغم من انخفاض نسبة نجاح هذه التقنية (أقل من 0,1 ٪ من البويضات المعالجة تتطور الى أجنة)، فقد تم استخدامها بنجاح في تطوير حيوانات محورة وراثياً لإنتاج بروتينات مأشوبة مثل مضاد التريبسين ألفا1 (α_1- antitrypsin)، أو مفعل البلازمينوجين النسيجي (tPA)، أو الأورو كيناز (urokinase)، أو عامل النمو الشبيه بالإنسولين ـ 1 (IGF-1)، أو الإنترلوكين ـ 2 (IL-2)، أو اللاكتوفيرين (lactpferrin) أو ألبومين مصل الإنسان بعطاءات تصل حتى $35 gL^{-1}$ في الحليب. هذه البروتينات المنتجة من الممكن عزلها من الحليب من أجل استخدامها طبياً أو تناولها بالحليب مباشرة. وبما أنه يمكن للبقرة الحلوب العالية الأداء أن تنتج حوالى L 10000 حليب في العام، فإنه يمكن لبقرة واحدة محورة وراثياً أن تنتج كمية من العامل الثامن تكفي الولايات المتحدة الأمريكية بأكملها (g120).

الزرع الغريب (Xenotransplantation) . حتى الآن، هناك أكثر من 200000 شخص قام بزرع عضو في جسده. وفي الولايات المتحدة الأمريكية وحدها، يوجد حوالى 45000 شخص ينتظرون للحصول على قلب من أجل زرعه، على الرغم من توفر 2000 قلب تقريباً للزراعة سنوياً. على ضوء ذلك، تتم حالياً دراسة الحيوانات المحورة وراثياً كمانحات للأعضاء، في حين يعتبر الخنزير الحيوان الأكثر ملاءمة لأن أعضاءه مشابهة لأعضاء الإنسان بالحجم، والتشريح، والوظيفة. إلا أن المسألة المفتاحية في الزرع الغريب هو رفض العضو من خلال رد الفعل المناعي. في هذا السياق يمكن التمييز بين 1) الرفض المناعي الفائق الحدية (hyperacute immunorejection) (ثوان الى دقائق)، المعتمد على التفعيل السريع لنظام المتممات (complement system) في المستقبِل؛ 2) الرفض المناعي الحاد (أيام)، المعتمد على ردة فعل الخلايا التائية (T cells)؛ و3) الرفض المناعي المزمن (حتى عدة سنوات)، حيث إن آليته غير معروفة. إن الهدف الأولي عند زرع الأعضاء من أنواع كائنات أخرى هو منع الرفض المناعي الفائق الحدية. حتى الآن، تم الحصول على خنازير استبدل فيها التسلسل البروتيني من المتممات بعوامل بشرية. ويعتبر العامل hCD55 (عامل تسريع الاضمحلال (decay accelerating factor (DAF)) . من المحسنات المفتاحية للكلونة، فعندما تم زرع قلوب الخنازير المحورة وراثياً المحتوية على هذا العامل في نظم المتممات لديها، أُنقذت حياة المرضى المستقبِلون حتى 40 يوماً، بينما مات الأشخاص الذين تلقوا زرع القلب من خنازير طبيعية (controls) خلال دقائق. إضافة إلى ذلك، تُعد إزالة جين أنزيم الغلاكتوزيل ترانسفراز ألفا 3، 1 (galactosyl transferase-3,1α) الموجودة في الخنزير هدفاً آخر، لأن ثمالات الغلاكتوز الطرفية المرتبط برابطة ألفا ((linked terminal galactose residues -) هي موجودة على أعضاء وأنسجة الخنزير فقط، بحيث تمهد لتشكل أجسام مضادة ضدها عند الإنسان.

تحسين الأداء في الحيوانات المحورة وراثياً		
	التأثير	البروتين أو الجين المشفر المستهدف
الخنزير	متلازمة الحرارة المرتفعة الخبيثة أيض الكالسيوم في العضلات	جين مستقبل الريانودين (*RYR1*) على الصبغي 6: سيستيئين ---> أرجنين.
الماشية (البقر)	الكازيئين-K: نوعية الحليب	جين الكازيئين-K
سمك السلمون	بروتين مضاد التجمد (antifreeze protein (AFP)) لتعزيز تحمل الحرارة المنخفضة	التعبير عن الجين المشفرة لـAFP المأخوذ من السمك المفلطح الشتوي



التعبير عن بروتينات علاجية في حليب حيوانات محورة وراثياً			
التركيب الجيني	البروتين المأشوب	الكمية المُعبَّر عنها (mg/L)	الحيوان المحور وراثياً
WAP	مفعل البلازمينوجين النسيجي (DNA متمم)	50-0	الماعز
WAP	البروتين C (DNA متمم)	1000	الخنزير
BLG	مضاد التريبسين-α_1 (DNA جينومي)	35000	النعجة
BLG	ألبومين المصل البشري	10000	الفأر
الكازيئين- β البقري	مفعل البلازمينوجين النسيجي (DNA متمم)	3000	الماعز
الكازيئين αS1 البقري	الأوروكيناز (DNA جينومي)	2000	الفأر
الكازيئين αS1 البقري	عامل النمو الشبيه بالإنسولين (IGF-1) (DNAمتمم)	10000	الأرنب

WAP- بروتين مصل اللبن الحمضي (whey acidic protein) BLG- لاكتوغلوبولين-β البقري (bovin β-lactoglobulin)

مقارنة الإنتاجية			
البروتين	التسويق في الولايات المتحدة (kg في السنة)	من بلازما الإنسان (L)	عدد الأبقار الحلوبة (إنتاج الحليب-10000L في السنة)
العامل الثامن	0,120	$12x10^5$	1,2
بروتين C	100	$20x10^6$	100
مولد الفيبرين	200	$5x10^5$	20
مضاد التريبسين-α_1	800	$4x10^6$	80
ألبومين مصل الدم	100000	$2x10^6$	5000

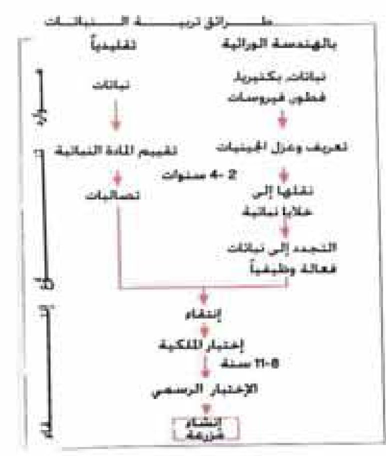
تربية وتأصيل النبات (Plant breeding)

عموميات (General). بدأ الإنسان زراعة النباتات منذ 11000عام تقريباً. ونتيجة لعملية التربية والتأصيل الطويلة، تُعطي النباتات اليوم كتلة حيوية أكبر وثماراً وبذوراً أكثر مقارنةً بأسلافها البرية. تشكل هذه النباتات المزروعة مصدراً رئيسياً هاماً لتغذية الإنسان وحيواناته البيتية. إلا أنه حتى في يومنا هذا فإن حوالى 1/ 3 سكان العالم البالغين 6 مليارات نسمة غير مغذى بشكل جيد. ولأنه من المتوقع أن يتضاعف المجتمع البشري خلال الخمسين سنة القادمة، فإن الزيادة في الإنتاج النباتي ستكون متطلباً أساسياً للمستقبل.

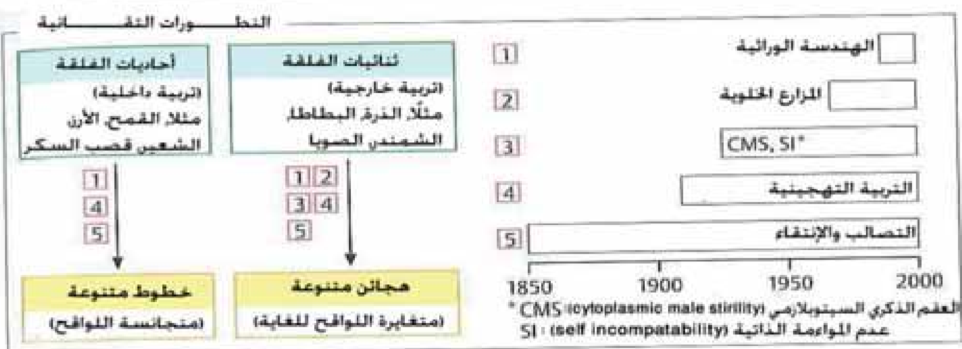
تربية وتأصيل النبات (Plant breeding). يدعى ناتج عملية تربية وتأصيل (breeding) النبات بالصنف (cultivar): وهو خط نبات ذي خصائص نموذجية خاصة بتنوعه ـ صنفه ـ النباتي (variety) ومتوارثة عند التكاثر. ينشأ الصنف النباتي من جراء التهجين (crossing) والانتخاب (selection). واعتماداً على نمط التكاثر، ومصدر حبوب الطلع، والبنية الوراثية للنبتة وتركيبها الوراثي، يمكن تمييز الخطوط، والمجتمعات، والكلونات (النسائل) المصنعة، والهجائن (hybrids) لمختلف أصناف النباتات. فبالنسبة إلى النباتات ذاتية التلقيح، كالقمح، والأرز، والشعير وقصب السكر، يمكن الحصول فيها على أصناف متجانسة وراثياً. أما النباتات المزهرة الأخرى كالذرة، والبطاطا، وفول الصويا، والشمندر السكري التي تُربى (تتوالد) خارجياً (outbreeding) فهي متغايرة اللواقح (heterozygous) للغاية. لكنه إن أمكن تكاثرها بالنمو النباتي (vegetatively) كما هو الحال، مثلاً، في البطاطا والشمندر السكري فإنه يصبح من الممكن الحصول على أصناف مصنعة (synthetic) أو نسيلة (clonal) ذات نمط وراثي (genotype) ضيق. يمكن أن تربى النباتات المرباة (تتوالد) خارجياً وتؤصل فتكون متغايرة اللواقح بشكل كبير، لكنه لدى تخصيبها ذاتياً عنوة (التربية الداخلية)، فإنها تشكل أصنافاً هجينة متجانسة تماماً. ففي تربية وتأصيل بعض النباتات كالذرة، تتم إزالة الأزهار الذكرية لهذا الغرض، في حين تعتبر هذه العملية (التربية الذاتية) صعبة إذا اجتمعت الأعضاء الزهرية الذكرية والأنثوية بزهرة واحدة. والحل لهذه المشكلة يتجلى في استخدام خطوط أبوية عقيمة الذكر، بحيث يمكن الحصول عليها بإحدى الطريقتين: من أصناف ذات عقم ذكري سيتوبلازمي ((cytoplasmic male sterility (CSM)، مُشفَر عنه في جينوم الميتوكندريا) أو باستخدام خطوط غير متوائمة ذاتياً ((self-incompatible (SI)، وهي آلية واسعة الانتشار لمنع التأبير الذاتي (self-pollination). غير أن الأفراد المتغايرة اللواقح غالباً ما تكون أكثر قوة من الأفراد متماثلة اللواقح، وذلك يعود على ما يبدو إلى أن منتجات الجين المتغاير الأليل (heteroallelic) يكون احتمال تعطلها أقل أو أنها تظهر مدى وظيفي (فعالية) أوسع. هذه الخاصية (تعاظم القدرة (heterosis)) في النمو غالباً ما تستخدم من أجل التلقيح الرجعي (backcrossing)، على نحو مشابه بالطرائق المستخدمة في الكائنات الحية الدقيقةَ المنتجة للمضادات الحيوية. كما وتستخدم بروتوكولات مشابهة في الصناعة البستانية، التي طورت ما يزيد على 11000 صنف بقيمة إنتاج تقدر بـ 10 بلايين يورو في ألمانيا وحدها.

علم الغابات (Forestry). قاد القطع غير المضبوط للغابات مع بدايات تاريخ الإنسان إلى تأكل وتعرية مساحات واسعة من الأرض. وهذه العملية تحدث اليوم أيضاً في الغابات الاستوائية المطيرة. فقط منذ حوالى عام 1800 تم تأسيس أول نظام أحراج منيع وذلك في وسط وشمال أوروبا (مثلاً، يجب أن يبلغ الصنوبر عمر 100 سنة قبل قطعه، السنديان حتى 300 سنة). يعد الخشب (بإنتاج سنوي يقارب 7 × 10 طن) مصدراً متجدداً هاماً، وربما سيستخدم بشكل أكبر في المستقبل لإنتاج المواد القائمة على أساس كيميائي بما في ذلك المواد الأولية المستخدمة في التخمير. أما اليوم فيستخدم الخشب بشكل أساسي في صناعة الأثاث، والألواح الخشبية، والورق والصناعات السيلولوزية (cellulose).

إجراءات تقانية حيوية حديثة (Modern biotechnology procedures). يمكن أيضاً تحقيق العقم الذكري الهام لتربية وتأصيل هجائن متجانسة اللواقح (homozygous hybrids)، بواسطة تقنيات الهندسة الوراثية، وذلك، مثلاً، عن طريق التعبير عن الأنزيم الفعال جداً الـ RNAase من بكتريا *Bacillus amyloliquefaciens* تحت ضبط محث (promoter) محدد وخاص بحبوب الطلع، مما يقود الى تعطيل فعالية الطلع .كما يمكن تعديل هذه العملية وذلك بالتعبير عن مورث مجدد يعطل نشاط أنزيم الـ RNase . لقد أحدث تحضير الجُسأة ـ الكالوس ـ (callus)، والنسيج الإنشائي (meristem)، والحبلات المجردة (protoplasts) والمزارع أحادية الصيغة الصبغية، التي يمكن غالباً إعادة تجديدها إلى نباتات كاملة ثنائية أو أحادية الفلقة، ثورة في علم تربية وتأصيل النباتات، وذلك لأنه استطاع أن يسرع بشكل ملحوظ الخطوات التقليدية في الانتقاء. يمكن للنباتات المحورة وراثياً أن تعبّر عن عوامل لمقاومة الفيروسات، أو الفطور، أو البكتريا، أو المبيدات العشبية أو الحشرية، كما يمكن أن تتم هندستها لتعبّر عن منتجات عالية القيمة. إضافةً إلى ذلك، إن التسلسلات الكاملة للجينوم النباتي على وشك أن تؤسس إلى استراتيجيات هادفة في مجال تربية وتأصيل النبات.



المنتج/ النبتة		الإنتاج العالمي (10^6 طن)
إنتاج النباتات الزراعية (عام 2000)		
السوكروز	Saccharum officinarum	1260
الذرة	Zeamays	594
الأرز	Oryza sativa	594
القمح	Trriticum aestivum	584
الكتان	Linum usitatissimum	503
البطاطا	Solanam toberosum	321
قصب السكر	Beta vulgaris	246
منيهوت	Manihot esculenta	175
حبوب الصويا	Glycin max	161
البطاطا الحلوة	Ipomoea batatas	142
الشعير	Hrdeum vulgare	132
البندورة	Lycopersicon esculentum	98
الخمر	Vitis vinifera	64
الذرة البيضاء	Andropogonoideae	58



	الأنواع	عدد الصبغيات	الصيغة الصبغية	الجينوم 1000Mbp
حجم جينوم النباتات				
أحاديات الفلقة				
الشعير	*Hordeum vulgare*	7	2	4.8
الأرز	*Oryza sativa*	12	2	0.42
القمح	*Triticum aestivum*	7	6	16
ثنائيات الفلقة				
الذرة	*Zea mays*	10	2	2.5
الأرابيدوبسيس	*Arabidopsis thaliana*	5	2	0.1
اللفت	*Brassica napus*	19	2	1.23
البندورة	*Lycopersicon exculentum*	12	2	1
التبغ	*Nicotiana tabacum*	12	4	4.4
البطاطا	*Solanum tuberosum*	12	4	1.8

• مزارع أنسجة النبات السطحية

(Plant tissue surface culture)

عموميات (General). لقد أصبح ممكناً خلال الأربعين سنة الماضية إكثار أنسجة وخلايا الأعضاء النباتية (جذور، أوراق، . . . الخ) كمزارع أعضاء. فمن خلال المعالجة بالهرمونات النباتية، يمكن إعادة تشكيل هذه الزراعات إلى نباتات كاملة مثمرة. هذه الطريقة هي واسعة التطبيق في مجال الأبحاث الأساسية، ولكنها تُستخدم أيضاً في 1) إنتاج أعداد كبيرة من النباتات من المخزون النباتي بواسطة الإكثار الدقيق (micropropagation)؛ 2) تربية وتأصيل (breed) النباتات بخصائص محسنة (الانتقاء بالزجاج (in-vitro))؛ 3) إكثار نباتات الزينة والحدائق الخالية من الفيروسات؛ 4) إنتاج نباتات محورة وراثياً؛ 5) المحافظة على الأنواع النباتية المهددة بالانقراض على شكل مزارع خلوية قابلة للتجديد (بلازما بذرية). كما يمكن استخدام زراعة الأنسجة النباتية لتحضير منتجات النبات الثانوية.

الطرائق (Methods). يتم فيما يعرف بعملية تشكل الأجنة من الخلايا الجسمية (somatic embryogenesis)، نقل النسيج المأخوذ من العضو النباتي المرغوب الذي تمّت تنميته من بذرة عقيمة إلى وسط نمو ضمن شروط معقمة. إن معظم الخلايا والأنسجة هي غيرية التغذية (heterotrophic)، وعليه فإنها تتطلب في نموها مصدراً كربونياً كالغلوكوز (glucose) أو السكروز (saccharose) ومصدراً آزوتياً كالنتريت (nitrite). كما يتضمن وسط النمو فيتامينات، وعناصر ضئيلة المقدار، وسيتوكينات (cytokines) نباتية مثل الكينيتين (kinetin) أو الزياتين (zeatin) وعوامل نمو كالـ 3-indolyl acetic acid، أو 2,4-dichlorophenoxyacetic acid، أو abscisic acid. أمـــا الخلايا التي تصعب زراعتها فتستخدَم لها أوساط نمو أكثر تعقيداً. هذه الزرعات عادة ما تنمى ضمن غرف عقيمة حيث يمكن التحكم بالضوء، والرطوبة والحرارة (غرف مناخية). واعتماداً على شروط الزراعة والمادة الاستهلاكية المستخدمة، فإنه يمكن الحصول على الجُسْأة (callus) أو مزارع معلقة، أو الأنسجة الانشائية (meristem) أو مزارع أحادية الصيغة الصبغية (haploid cultures).

مزارع الجُسْأة (Callus cultures). يُدعى النسيج المجروح الذي ينمو بطريقة غير مضبوطة بالجُسْأة. تنشأ الجُسأة في النباتات من الأسطح المستوية للنبات المستقطع المسمى بالمزدرع (explantate). وهي يمكن أن تُزرع على سطح أطباق الأغار (agar) واستخدامها كمادة بادئة لإنتاج خلايا نباتية غير متمايزة (undifferentiated) كلية القدرة (omnipotent)، إذ يمكن توليد نباتات متمايزة بشكلٍ كامل من خلال معالجة مزارع الجُسْأة بهرمونات نباتية، شرط أن لا تكون هذه الزرعات قديمة جداً.

المزارع المعلقة (Suspension cultures). على نحوٍ شبيهٍ بالكائنات المجهرية أو الخلايا الحيوانية، يمكن إكثار الخلايا النباتية في أوساط مغذية سائلة عقيمة.

مزارع النسيج الإنشائي (Meristem cultures). إن خلايا النسيج الإنشائي هي الخلايا الجنينية للنبات القادرة على الانقسام اللامتناهي. وهي يمكن عزلها تحت شروط عقيمة من كوز النبات العديم الأوراق النامي على الأغصان، أو من الجذور أو من الأغصان الإبطية (axillary)، بحيث تنمو مثل مزارع الجُسْأة والمعلقات. ومزرعة النسيج الإنشائي هي مناسبة على نحوٍ فريد للإكثار الكثيف والحصول على نباتات نوعية (specific) خالية من الممرضات (pathogens). حتى وقتنا هذا، تُعرض خلايا النسيج الإنشائي إلى المعالجة بالحرارة (40ºC) لمدة قصيرة؛ من أجل الحصول على عطاء كبير من الزرعات الخالية من الفيروسات والممرضات، وذلك ربما بسبب تشكل بروتينات الصدمة الحرارية (heat shock proteins). وهكذا يتم الحصول من هذه الزرعات على نباتات خالية من الفيروسات والممرضات، لكنها لا تكون مقاومة للإصابات الجديدة. لقد أحدثت مزارع الأنسجة الإنشائية للكرمة، والفريز، والموز، وقصب السكر، والبطاطا ونباتات الزينة مثل القرنفل، والزنبق، والأقحوان، والسحلبيات، ثورة في ممارسات تنسيق الحدائق. كما يقدر سوق البذور والشتول الخالية من الفيروسات بثلاثة مليارات دولار سنوياً تقريباً.

مزارع أحادية الصيغة الصبغية ((Hapliod cultures). وهي مزارع خلوية لأعضاء النباتات الجنسية، خاصةً للأبواغ الدقيقة. فبعد إكثارها في الزرعات السطحية، يمكن لهذه الأبواغ أن تتشكل إما إلى نباتات عقيمة أحادية الصيغة الصبغية تضم مجموعة واحدة من الصبغيات أو، بوجود مسمم الانقسام الفتيلي (mitosis) الكولشيسين، أو بعد اندماج الجِبْلَة المجردة (protoplast)، إلى نباتات متجانسة اللواقح ثنائية الصيغة الصبغية (homozygous diploid). مثل هذه النباتات هي ذات أهمية كبيرة جداً لمربي النبات حيث إنها تقوم بتوريث مجموعة من الصفات الثابتة إلى ذريتها. تستخدم الزرعات أحادية الصيغة الصبغية في تربية وتأصيل (breeding) البطاطا، والشعير، وبذر اللفت، والتبغ وبعض النباتات الطبية.

التنوع جسدي التنسل (Somaclonal variation). على الرغم من الوثوق الكبير في النسلية الناتجة من الإكثار الدقيق (micropropagation) التقليدي، يمكن استخدام عدم الاستقرار الصبغي (chromosomal instability) للخلايا النباتية المزروعة من أجل استرجاع أنماط وراثية (genotypes) جديدة ومفيدة في تحسين النباتات الناشئة من الزرعات الخلوية.

تحضير وتوليد مزرعة أنسجة ناشئة

المزدرع ← خلايا منفردة ← مزرعة خلوية ← تجدد

تأثيرات الهرمون النباتي

آغار مغذي

	عدم النمو	البراعم	الجذور	الجُسأة	المزدرع
الأوكسينات (auxins)	-	0.03mg/L	3.00mg/L	3.00mg/L	-
السيتوكينينات (cytokinins)	0.2mg/L	1.00mg/L	0.02mg/L	0.2mg/L	-

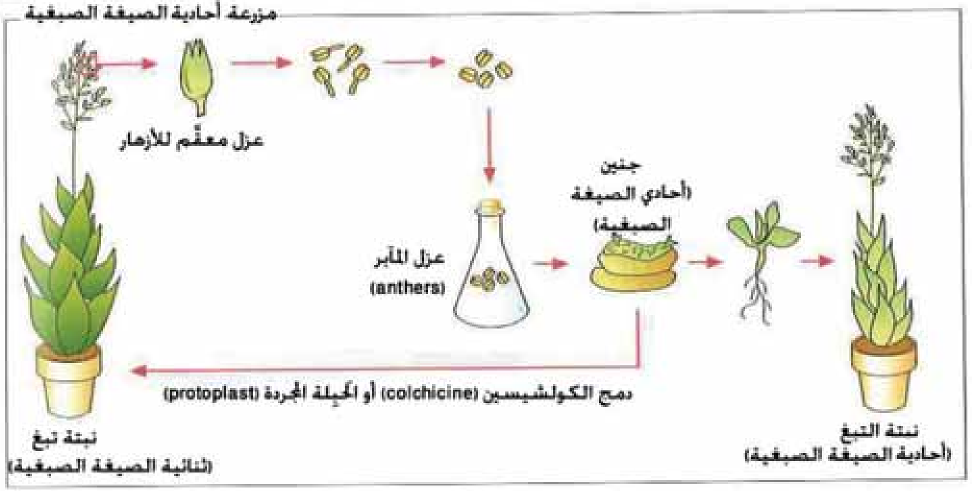
	البنية	الوظيفة*
الأوكسينات	3-إندوليل حمض الخل (4,2-فينوكسي ثنائي الكلور - dichlorophenpxy -24-)، حمض الخل (أوكسين مصنّع) وآخرون	تحرض على النمو الطولي تثبط التراكيز الأعلى تشكل الجذور الإنقسام الخلوي
السيتوكينينات	الكينيتين (kinetin)، بينزيل أمينو بيورين (benzyl 6- aminopurine)، جبيريلين (gibberllins)، وآخرون	تنشط تشكل الجُسأة النمو الخلوي، والنمو الطولي

* الأوكسين فقط: تشكل الجُسأة *السيتوكينينات فقط: إنقسام خلوي مخفّض

النباتات الخالية من الفيروسات الناجّة عن مزرعة الأنسجة الناشئة

	التخلص من
الأقحوان	فيروس الأقحوان B، فيروس تقزم الأقحوان
البندورة	فيروس تجعد البندورة
الفريز (فراولة)	فيروس نيبو (nepovirus) وآخرون

مزرعة أحادية الصيغة الصبغية



• مزارع خلايا النبات المعلقة

(Plant cell suspension culture)

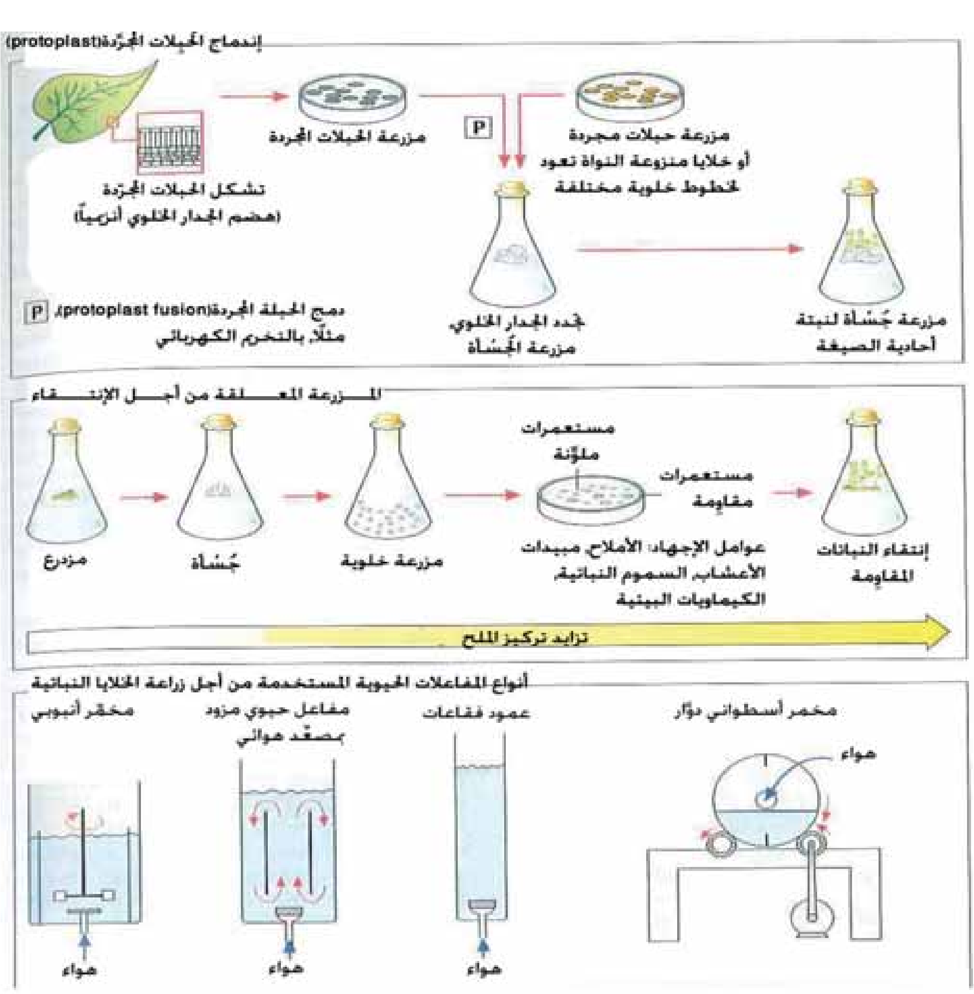
عموميات (General). على نحو شبيه بالكائنات المجهرية أو الخلايا الحيوانية، يمكن إكثار الخلايا النباتية في أوساط سائلة معقمة، ومهواة، ومضاف إليها الهرمونات النباتية (المزرعة المعلقة). وفي حالة وضع خلايا هذه الزرعات على سطح أوساط مغذية صلبة، فإنه بإمكانها أن تتطور إلى أجنة قادرة على تشكيل نباتات كاملة. إلا أن مزارع المعلقات تُستخدم من أجل 1) الغربلة السريعة للأصناف النباتية ذات الصفات الجديدة الواعدة؛ 2) تحضير خلايا الحبلة المجردة (protoplast cells) والنباتات المحورة وراثياً (transgenic plants)؛ و3) إنتاج المستقلبات الثانوية (secondary metabolites) النباتية في المفاعل الحيوي (bioreactor).

الطرائق (Methods). تُنقل الخلايا النباتية من المخزون (stock) أو من مزارع الجُسْأة (callus) إلى وسط سائل حيث تنمو بنمط غيري التغذية (heterotrophic)، أي بوجود مصادر للكربون والنتروجين، ومعادن وهرمونات نباتية. في الزرعات المعلقة تستخدم الدوارق الهزازة؛ أما لإنتاج المستقلبات الثانوية (secondary metabolites) فيفضل استخدام المفاعلات الحيوية ذات أحجام تصل إلى عدة أمتار مكعبة (m^3).

المزارع العلقة من أجل الغربلة (Suspension cultures for screening). وهي تعتبر وسيلة هامة لسبر (probe) الأصناف الخلوية ذات الخصائص الجديدة بسرعة، مثل، تعزيز تحمل الأملاح، أو تحسن المقاومة ضد مبيدات الأعشاب، أو تشكيل المستقلبات الثانوية (secondary metabolites). ولما كانت هذه الغربلة أسرع بكثير من الانتقاء التقليدي للأصناف الجديدة الذي يتم بالبَذْر، والنمو، ثم السبر لعدة أجيال، فقد أصبحت الطريقة الجديدة شائعة جداً في مجال تربية وتأصيل النباتات، مثل، تحسين فول الصويا، والحمضيات، وقصب السكر، والذرة، والقمح وأصناف البطاطا، وبشكل خاص في تحضير أنسال (هجائن) نباتية جديدة متحملة للممرضات والإجهاد. إلا أن إمكانية انتقاء بعض الطافرات ذات الصفات غير المرغوبة هي من بعض مساوئ هذه الطريقة. كما أن تشكيل نباتات كاملة من خلايا معلقة ليس دائماً أمراً سهلاً، إضافةً إلى أن مواصفات النباتات الكاملة المنتجة لا تتطابق دائماً مع تلك الملاحظة في الزرعة المعلقة. لذلك فإن الزرعات المعلقة تستخدم بشكل واسع من أجل الغربلة، مثلاً، في انتقاء النباتات المحورة وراثياً التي تعبّر عن صفة وراثية مرغوبة تمت إضافتها بواسطة النقل الجيني الموجّه (targeted gene transfer).

مزارع الحبلات المجردة (Protoplast cultures). تتم بعناية إزالة الجدار الخلوي متعدد السكاريد للخلايا النباتية في محلول متساوي التركيز (isotonic solution) باستخدام أنزيمات السيلولاز (cellulases)، ونصفي السيلولاز (hemi cellulases)، والبكتيناز (pectinases). بعد ذلك، يمكن دمج (fuse) الحبلات المجردة المتحررة مع حبلات مجردة أخرى عن طريق إجراءات كيميائية أو كهربائية (دمج الحبلات المجردة (protoplast fusion)) للحصول على أنسال ـ هجائن ـ جسمية (somatic hybrids) ذات جينومات مدمجة. في حالة دمج الحبلات المجردة مع سيتوبلاست (cytoplast) منزوع النواة، عندئذٍ يكون من الممكن نقل صفات متجانسة اللواقح الموروثة (inheritable homozygous traits) التي منشؤها العضيات السيتوبلازمية (الصانعات (plastids)). تستخدم هذه الطريقة بنجاح في نقل صفة العقم الذكوري السيتوبلازمي الهام جداً في تربية وتأصيل النبات حيث إنه يضمن تربية خارجية ـ توالد خارجي ـ (outbreeding) كاملة. لقد أجريت دراسات معمقة على دمج البروتوبلاست من أنواع مختلفة من النباتات (بطاطا + بندورة = بطادورة) لكنها حتى الآن لم تنجح في إنتاج أصناف نباتية جديدة.

مفاعلات الخلايا النباتية الحيوية (Plant cell bioreactors). يمكن أحياناً استخدام قدرة الخلايا النباتية على التكاثر بشكل مزارع معلقة خلوية ذات قدرة وراثية كاملة (genetically omnipotent cell) لإنتاج منتجات قيمة. فعلى سبيل المثال، يتم إنتاج مستقلبات ثانوية (secondary metabolites) كالشيكونين (shikonin)، والبربرين (berberin)، والتاكسول (taxol) صناعياً من مزارع معلقة نباتية باستخدام مفاعلات حيوية ذات أحجام قد تصل إلى عدة أمتار مكعبة. إلا أن المحاولات التي تم تنفيذها من أجل استخدام خلايا نباتية معلقة في عمليات التحول الحيوي ذات الخطوة الواحدة، مثلاً، تفاعلات إضافة الغلايكوزيل (glycosylation) أو الهيدروكسيل (hydroxylation) الانتقائية الموقع (regioselective)، لم تكن مجدية اقتصادياً، وذلك لإمكانية إجراء هذه التفاعلات في أغلب الأحيان بطريقة أبسط باستخدام أنزيمات أو كائنات مجهرية مأشوبة. في الحالة النموذجية لإنتاج مستقلب ثانوي، يتم نقل الخلايا المُعالَجة بهرمون ضوئي (photohormone) الناشئة من مزارع الجُسْأة (callus) إلى مزارع معلقة، ما يؤدي إلى زيادة مستوى المفاعل خطوة بخطوة. كما وتمّت دراسة المفاعلات المخفوقة، والمحمولة هوائياً، والمزودة بعمود فقاعات وغيرها من المفاعلات بشكل مكثف. وعلى الرغم من حل التحديات الهندسية للعملية المُتَضَمَّنة في هذه التقانة، إلا أن الثباتية المنخفضة للخطوط الخلوية ذات الإنتاج العالي لا تزال المشكلة، وهي تتفاقم مع واقع عدم فهم آليات التصنيع الحيوي لأغلب المنتجات النباتية الثانوية وكيفية تنظيمها.



المستوى، العطاءات، الملاحظات	التطبيق	المنتج	النبتة
مفاعل مصعّد هوائي بسعة 300L، عملية مستمرة، حوالى 75% عطاء خلال 40–60 ساعة	علاج القلب/الدورة الدموية	ميثيل دايغوكسين من الميثيل دايتوكسين (إضافة هايدروكسيل في الموقع β 12	*Digitalis lanata*
مفاعل ذي مرحلتين، 200 أو 750L، لمدة 23 يوم	مستحضرات التجميل	الشيكونين (shikonin)	*Lithospermum erythrorhizon*
حتى 1.7g/L	المركبات الدوائية	بيربيرين بدائي (protoberbrin)	أنوع *Berberiis*
مفاعل بسعة 30L	صحياً	قطع الجنسنغ	*Panax ginseng*
	المركبات الدوائية	حمض الروزمارنيك (rosemarinic acid)	*Coleus blumei*
حتى 1g/L بعد 14 يوم	عامل مضاد للورم	التاكسول (taxol)	أنواع *Taxus*
16g/L بعد 45 يوم	مركبات عطرية	الفانيلين (vanillin)	*Vanilla planifolia*

• النباتات المحورة وراثياً: الطرائق

(Trangenic plants: methods)

عموميات (General). هناك العديد من الطرائق المتنوعة التي تم تطويرها لنقل الـ DNA الغريب إلى الجينوم النباتي. ويشكل البلازميد Ti، (plasmid Ti) المأخوذ من بكتريا A. tumefaciens الطريقة المختارة لهذا النقل في النباتات ثنائية الفلقة (dicots) كالبندورة، والتبغ، والبطاطا، والبازلاء والفول. كما جرى استخدام التخريم الكهربائي (electroporation) أو تحويل الحبل المجرد (protoplast transformation) بنجاح لهذا الغرض في النباتات ثنائية أو أحادية الفلقة التي يمكن أن تتشكل من الحبل المجرد. وبالنسبة إلى الخلايا النباتية السليمة فيمكن تحويلها بواسطة الحقن المجهري (microinjection) للـ DNA أو بواسطة المدفع الجيني (biolistic procedures). في النهاية، يتم تقييم نجاح عملية تحويل النباتات بالعادة بطرائق تفاعل البوليميراز التسلسلي (PCR) أو بواسطة الجينات المُخبرة (reporter genes) المصاحبة للتحويل.

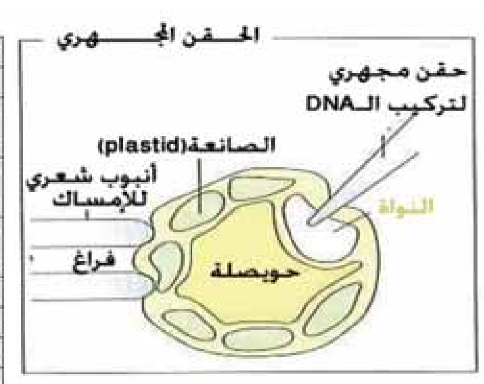
بلازميد Ti، (Ti plasmid). تستطيع بكتريا التراب *A. tumefasciens* أن تصيب النباتات ثنائية الفلقة محدثة تكاثراً خلوياً سرطانياً عند رقبة الجذر، وهو ما يسمّى بمرض تدرّن الجذر. في هذه العملية، يتم نقل البلازميد Ti (محرض الورم (tumor-inducing)) الذي هو بحجم حوالى 200kbp إلى خلايا النبات مؤدياً الى إقحام الـ T-DNA، وهي شدفة DNA بطول 15 ـ 30 kbp، داخل DNA الصبغيات النباتية. ولتحوير النباتات ثنائية الفلقة، تم تطوير بلازميدات Ti المعدلة المبقية على صفة الإصابة، لكنها فاقدة لخصائص الإمراض. وهي تحتوي بالإضافة إلى الجين المراد نقله، وهو الـ T-DNA، على منطقة للتضاعف خاصة ببكتريا *E. coli* أو المضيف المخبري الآخر، بالإضافة إلى جين مُخبِر (reporter gene). تُنفَّذ عملية التحويل (transformation) عادة بإصابة الخلايا النباتية الحساسة بواسطة سلالات مأشوبة من بكتريا *A. tumefasciens*. وباستخدام محثات (promoters) متخصصة بالعضو وتسلسلات قائدة (leader sequences) تُمكِّن الـ T-DNA من التوجه الى الموقع المرغوب في الخلية المستهدفة (ورقة، ساق، جذر أو حيزات الخلية الفرعية كالصانعة اليخضورية (chloroplast) والميتوكوندريا). كما يمكن أيضاً تحفيز تعبير DNA البلازميد بعوامل خارجية مثل الحرارة المرتفعة، الجفاف، الإصابة بالممرضات، نوعية الإضاءة، أو الدورات اليومية. وفي بعض الأحيان يُستَخدم البلازميد Ri، (Ri plasmid) المأخوذ من بكتريا A. rhizogenes بطريقة مشابهة. إلا أن الفيروسات النباتية مثل caulimo أو Gemini هي أقل ملاءمة كنواقل: فهي يكون لديها إما إمكانية صغيرة جداً لتستوعب الجين الغريب أو طيف إصابة صغير جداً أو نمط تضاعف معقد للاستخدام العملي.

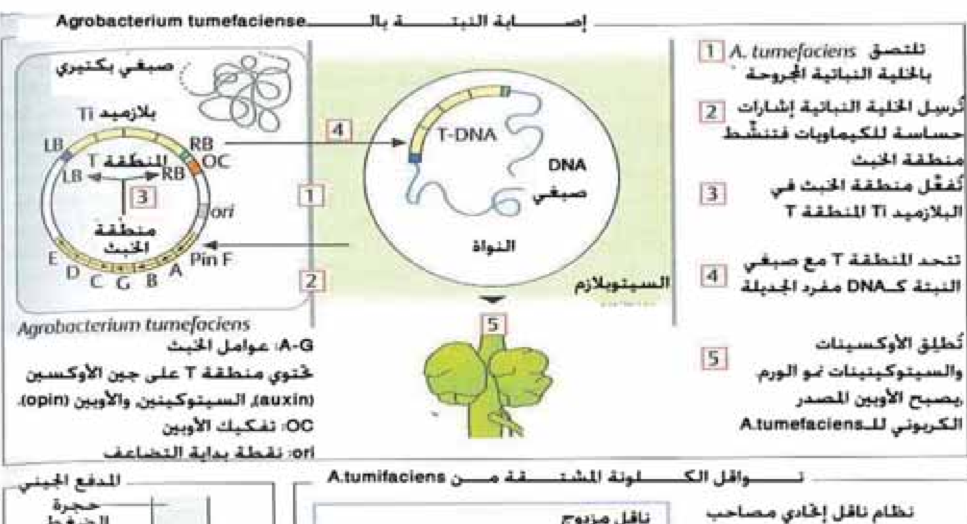
النباتات أحادية الفلقة المحورة وراثياً (transgenic monocots). هناك العديد من النباتات أحادية الصيغة الصبغية كالقمح، والشعير، والأرز والذرة الهامة جداً زراعياً، لكنه حتى وقت قريب لم يكن تحويلها (transformation) بواسطة بكتريا *A. tmmebasciens* ممكناً. مع ذلك، أظهرت أعمال بحثية جديدة إمكانية استخدام المحرض syringeom كإشارة كيميائية لتفعيل المنطقة الإمراضية ـ منطقة الخبث ـ من البلازميد Ti (Ti plasmid) في أحاديات الفلقة. فباستخدام مثل هذه البروتوكولات، أصبح بالإمكان تحويل خلايا أحاديات الفلقة بنظام البلازميد Ti. ولكن تشكل إعادة تشكيلها لنباتات كاملة مأشوبة تحدياً آخر، مُحِدّاً بذلك من استخدام جميع الطرائق المعتمدة على الحبلات المجردة (protoplasts)، كالحقن المجهري (microinjection)، والتخريم الكهربائي (electroporaion) ودمج الليبوزوم (liposome fusion). بالنتيجة، أصبح المدفع الجيني (biolistics) الطريقة المختارة حيث تقذف الأجنة النباتية بجسيمات عالية التسارع من الذهب أو التنجستين (tungsten) المدمص عليها الـ DNA الغريب.

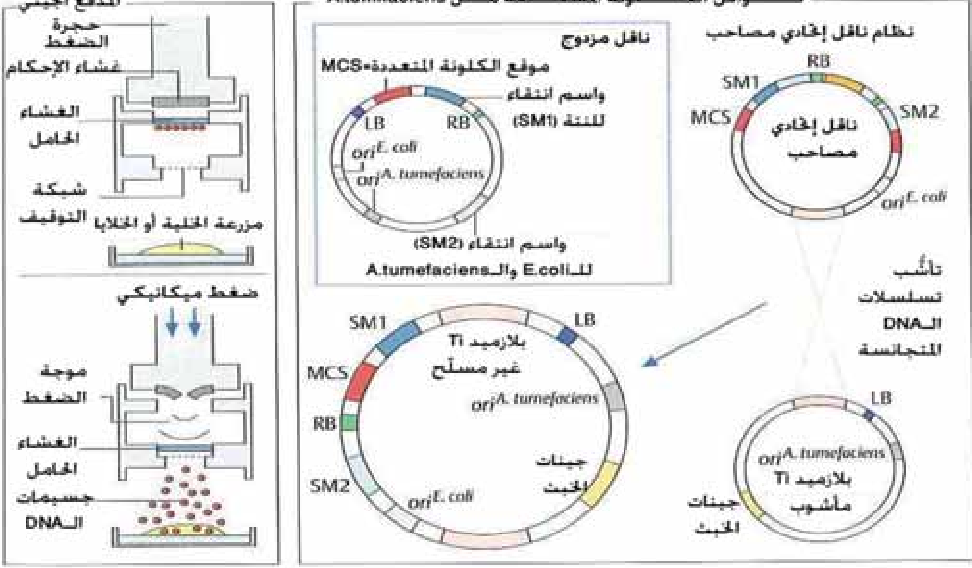
التدخل في التعبير الجيني (Interference with gene expression). يستخدم بشكل أساسي إثنان من البروتوكولات للحصول على نباتات منقوصة جين محدد (knockout plants). في الأول، يتم إدخال امتداد من الـ DNA الغريب في منطقة الجين المستهدف بواسطة التأشيب المتجانس (homologous recombination) بشكل مشابه لتحضير حيوانات منقوصة جين محدد. لكنه على العكس من حالة الحيوانات، فإن فعالية هذه الطريقة منخفضة جداً عند النباتات.أما في الثاني، فيمكن الحصول على نتائج أفضل بكثير، وذلك لدى إدخال نسخة من الجين المستهدف، تحت تأثير محضض (promtor) قابل للتحريض، بالاتجاه المعاكس لقراءة تسلسل الـ DNA. وبذل تقوم النباتات المحوّلة (transformed) بنسخ هذا الجين إلى RNA مضاد للتعبير (antisense RNA)، وبالتالي يتكامل (يرتبط) مع الـ RNA الرسول (mRNA) للجين الصحيح ليتم تحطيمه بواسطة أنزيم الـ RNase على أنه معقد RNA غير فعال وظيفياً. بما أن هذه العملية هي إحصائية، فإن نسبة النجاح فيها تتراوح بين 1 و2٪.

الجينومات (المركبات الوراثية) النباتية (Plant genomes). إن أول جينوم نباتي اكتمل تسلسله هو جينوم نبات *Arabidopsis thaliana* البالغ حجمه 100Mbp موزعاً على 5 صبغيات. كما تم مؤخراً إنهاء تسلسل جينوم صنفين من نباتات الأرز (*Oryza sativa*) بحجم 420Mbp موزعة على 12 صبغياً. تركز الآن مشاريع سلسلة الجينومات النباتية الأخرى على جينومات أكبر مثل جينوم الذرة، التبغ، القطن والبطاطا.

طرائق التحويل		
	أحاديات الفلقة	ثنائيات الفلقة
الحقن المجهري (الخلايات المجردة (protoplasts))	+	+
التعداء (الخلايات المجردة، Ca^{2+})	0	+
التخريم الكهربائي (الخلايات المجردة)	0	+
المدفع الجيني	++	+
T-DNA	+	++
فيروسات النباتات	0	0
0: ناجح أحياناً +: ممكن ++: الطريقة المختارة		







• النباتات المحورة وراثياً: المقاوَمة
(Transgenic plants: resistance)

عموميات (General). في الولايات المتحدة الأمريكية سُجلت أكثر من 30 نبتة محورة وراثياً للاستخدامات الزراعية، وهي تُزرع بمساحات تفوق الـ 35 مليون هكتار. تضم هذه النباتات كلاً من القطن والبطاطا والذرة واللفت والصويا والبندورة المحورة وراثياً. يتم التحوير في أغلب الحالات، بالجينات الغريبة التي تحمل المقاومة لمبيدات الأعشاب، أو مبيدات الحشرات أو الفيروسات. في حين أن النباتات ذات التحمل المعزَّز للإجهادات ونباتات الزينة ذات الألوان المعدلة هي في مرحلة متقدمة من التطور.

النباتات المتحملة لمبيدات الأعشاب (herbicide-tolerant plants). تبلغ الخسارة الناجمة عن الأعشاب الضارة حوالى 10 ٪ من المحصول الزراعي. في حين يجب أن يكون مبيد الأعشاب المثالي فعّالاً عند تراكيز منخفضة، وألاّ يثبط نمو النباتات الزراعية، ويمكنه التفكك بسهولة، ولا يصل إلى المياه الجوفية. أما النباتات المحورة وراثياً فتقلل من الحاجة إلى استخدام مبيدات الأعشاب لكونها جُعلت بالتحوير الوراثي مقاومة من خلال 1) احتوائها على كمية زائدة من البروتين الحساس لمبيدات الأعشاب، أو 2) إظهارها ارتباطاً منخفضاً بمبيدات الأعشاب، أو 3) تثبيطها لفعالية مبيد الأعشاب من خلال تفكيكه حيوياً. وكمثال على ذلك، تم إنتاج نبات فول الصويا المقاوم لمبيد الأعشاب غليفوسات (glyphosate) (Roundup™) ذي الطيف الواسع، عن طريق عزل سلالات من الـ *E. coli* المقاومة للغليفوسات، ثم عزل الجين البكتيري المشفر لأنزيم السينثاز 5-O-enolpyruvyl shikimic acid-3-phosphate synthase (مستهدف مبيد الأعشاب، ESPS synthase)، ثم التعبير عنه في نبتة فول الصويا تحت سيطرة محضض (promoter) نباتي. كما تم جعل نباتات التبغ، والبطاطا، واللفت، وغيرها من النباتات مقاومة لمبيد الأعشاب الـ phosphinothricine (BASTA™)، المثبط لأنزيم الغلوتامين سينثاز، عن طريق تعبيرها عن أنزيم الترانسفراز phosphinothricine acetyltransferase (PAT) المعزول من بكتيريا الـ *Streptomyces hygroscopicus*.

النباتات المقاومة للحشرات (Insect-resisant plants). تصنع بكتريا *Bacillus thurngensis* بروتين (S-endotoxin Bt toxin) ذا وزن جزيئي قدره 250kDa، الذي يشكل بعد تحلله في أمعاء الحشرات بروتيناً شديد السمّيّة. لا يحدث هذا التحول في النباتات والثدييات، ولذلك تم التعبير عن هذا البروتين، بروتين Bt، في الكثير من النباتات كمبيد حشري بروتيني. وباستعمال شيفرات مؤمثلة ومحضضات قوية فعّالة في أساسها، إزداد معدل التعبير، مثلاً، عن بروتين S35 لفيروس موزاييك القرنبيط، بحوالى 1000 مرة. كما استخدمت بنجاح مثبطات البروتياز المكلونة كعوامل أخرى في مكافحة الحشرات.

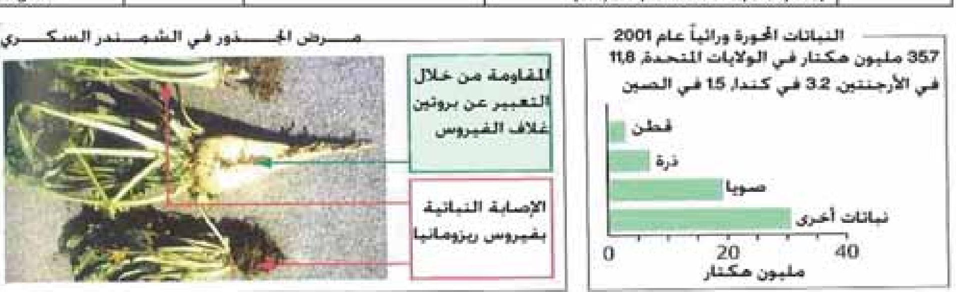
النباتات المقاومة للفطريات (Fugus-resistant plants). تؤدي الإصابة الفطرية إلى خسائر كبيرة في المحاصيل. ويعتبر مرض ذبول البطاطا (الذي يسببه العامل الممرض الفطري *Phytophora infestans*) مثالاً تاريخياً على ذلك، حيث سبب في القرن التاسع عشر مجاعات في جميع أنحاء أوروبا وخاصةً في إيرلندا. إلا أنه من خلال زيادة التعبير عن أنزيمات الغلوكاناز (glucanases) أو الشيتيناز (chitinases) النباتية المصدر زادت مقاومة التبغ ضد الفطريات. كما تم تحقيق بعض النجاح في مجال استخدام البروتينات المعطَّلة ريبوزومياً (ribosome-inactivated protein (RIP)).

النباتات المقاومة للفيروسات (Virus-resistant plants). وتسبب الفيروسات أيضاً خسارة كبيرة في المحاصيل الزراعية، مثل فيروس البطاطا 4 أو فيروس *Rhizomania* في الشمندر السكري. لقد جرت المحاولات في مجال زيادة مقاومة النباتات للإصابات الفيروسية عن طريق التدخل بتضاعف الفيروس، وذلك عبر إنتاج بروتينات الغلاف الفيروسي غير الفعالة وظيفياً في النباتات (الحماية التصالبية). كما تم البحث في مجال التعبير عن أجسام مضادة للفيروسات أو لـرايبوزيمات رأس المطرقة (hamarhead ribozomes).

النباتات ذات التحمل المعزز للإجهادات (Plants wih enhanced stress tolerance). يترافق العديد من أشكال الإجهادات الفيزيولوجية (الضوء الشديد، إشعاعات UV، الحرارة، الجفاف) مع تشكل جذور الأكسجين، وبشكل خاص تشكل جذر الأكسجين السالب. إلا أن النباتات المحورةً وراثياً المعبّرة عن الجين الذي ينتج أنزيم تحت تأثير محضض الـ 3S لفيروس موزاييك القرنبيط، لم تكن فقط مقاومة للإجهادات الفيزيولوجية، وإنما كان ذبولها أبطأ.

تغيير ألوان الأزهار وتعميرها (Altered blssom colors, aging). يعتبر الشكل واللون صفات هامة في نباتات الزينة، وهي صفات موازية لثباتية التخزين والنكهة في الفاكهة. هذه الصفات يمكن التأثير فيها من خلال دمج جين غريب أو تعطيل التعبير (silencing) عن جينات موجودة بالأصل (indigenous genes). على سبيل المثال، تم التعبيرعن جينات مسؤولة عن الأيض الثانوي لنباتات أخرى من أجل تعديل التصنيع الحيوي لحوامل الخاصة الصبغية (chromophore) التي تنخرط غالباً ضمن أيض الفلافونويدات (flavonoides) أو الأنثوسيان غلايكوزيد (anthocyan glycoside). ففي الأزهار الزرقاء، يتم التعبير عن أنزيم الأكسجنة الأحادي P450، (monooxygenase P450) المأخوذ من القرنفل الذي يضيف مجموعة الهيدروكسيل (hydroxylate) إلى مركب الـ dihydroquercetin لإعطاء منتج الصبغة الزرقاء. كما أنه من أجل تعطيل التعبير عن بعض الجينات، تم توظيف تقنية تعطيل التعبير الجيني (antisense) بنجاح، ومن الأمثلة التجارية على هذا؛ بندورة Favr-savr™ التي يُعطل فيها أنزيم البكتيناز (pectinase).

النباتات المقاومة (أمثلة)				
النبات	منتج الجين المعبَّر عنه بإفراط/ المعدَّل/ أو المعطَّل	الخاصية المرغوبة	طريقة التحويل	الشركة
القطن	سينثاز الأسيتولاكتات	مقاومة ضد يوريا السلفونيل		DuPont
الذرة	سم البوتوليوم -δ الداخلي	مقاومة ضد تثقب الذرة		Decalb< Monsanto
	سينثاز الغلوتامين، ترانس أسيتيلاز ، سينثاز الـEPSP	مقاومة ضد الفوسفينوثريسين (phosphinothricine) والغلايفوسات (glyphosate)		Bayer Crop Science , Zeneca Seeds , Monsanto
الصويا	سينثاز الغلوتامين، ترانس أسيتيلاز ، سينثاز الـEPSP	مقاومة ضد الفوسفينوثريسين (phosphinothricine) والغلايفوسات (glyphosate)		Bayer Crop Science , Zeneca Seeds
البطاطا		مقاومة ضد خنفساء كولورادو		Monsanto
	أوكسيداز البولي فينول	الوقاية من التلون باللون البني	تركيب مضاد للتعبير	Bayer Crop Science , Zeneca Seeds , Monsanto
البابايا (papaya)		المقاومة ضد فيروس البقعة الحلقية للبابايا (papaya ringspot virus)		Cornell-University of Hawaii
البندورة	بولي غالاكتويورناز	نضوج متأخر	تركيب مضاد للتعبير	Calgene , Monsanto "Flavr Savr"
		جلد أسمك، نضوج متأخر	تركيب مضاد للتعبير	Zeneca Seeds
	مونيلين (monillin)	تعزيز التحلية	البلازميد Ti	
البتونيا (petunia)	داي هايدروكومبفيرول ريداكتاز (dihydrokaempferol reductase) من الذرة	بتلات مجعدة	تركيب معبر	Max-Planck-Institute
الورد	داي هايدرو كيرسيتين-'5-هايدروكسيلاز (dihydroquercetin-5'-hydroxylase)	صبغة زرقاء	تركيب معبر	Suntory , Calgene





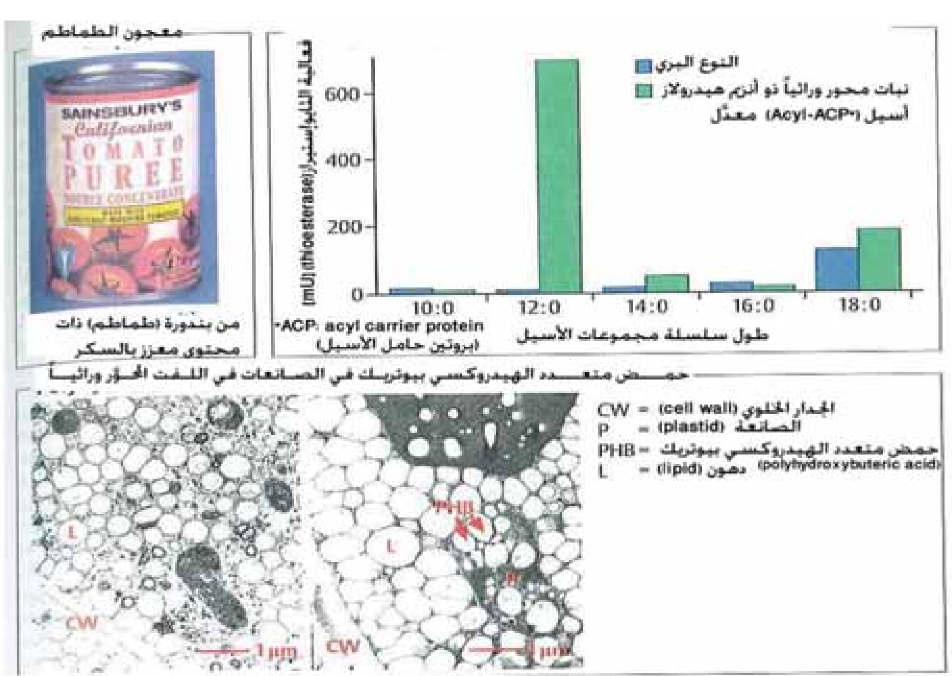
النباتات المحورة وراثياً: المنتجات

(Transgenic plants: products)

عموميات (General). بشكلٍ عام لا يضم التعديل في النباتات بالهندسة الوراثية فقط تعديل المواد الكيميائية للنبتة (المصادر المتجددة)، وإنما يشمل أيضاً تصنيع مواد كيميائية قيمة في النباتات المحورة وراثياً. مثلاً، 1) التعديل في الأحماض الأمينية، أو النشاء، أو اللغنين (lignin)، أو تركيب الزيوت؛ 2) التعبير عن مستضدات (antigens)، أو شدف مستضدات (أجسام مضادة نباتية (plantibodies))، أو لقاحات، أو ألبومين المصل البشري، أو البولميرات الحيوية.

التعديل في المواد الكيميائية النباتية Modification of plant chemicals. لقد تم اكتشاف عدة طرق في تزويد البروتينات النباتية بأحماض أمينية أساسية مطلوبة في غذاء الإنسان (عادةً، اللايسين-L والمثيونين -L): 1) التعبير عن بروتينات من نباتات أخرى تمتلك تركيباً أكثر ملاءمةً؛ 2) التطفير الموجه في الموقع (site-directed mutagenesis) لبروتينات التخزين داخلية المنشأ (indigenous) يتم فيها استبدال الأحماض الأمينية غير الأساسية بأخرى أساسية؛ و3) كلونة (cloning) جينات لأنزيمات مفتاحية لانظامية (deregulated) في مسارات الأيض (metabolism) المتفرعة، مثلاً، أنزيم الأسبارتوكيناز (aspartokinase) من *E. coli* وأنزيم تنشؤ - سينثاز - الدي هايدروديبيكولينيك (dehydrodipiccolonic acid synthaes) من Corynebacterium من أجل تعزيز تصنيع اللايسين ذي الوضعية L. أما بالنسبة إلى التصنيع الحيوي للنشاء، فإن أنزيم ADP glucose pyrophosophorylase هو أنزيم متفارغ (allosteric) أساسي في هذه العملية موجود في أغلب النباتات. وبغية زيادة نسبة النشاء وتعديل تركيبه، جرى التعبير عن العديد من الأنزيمات غير المنظمة (nonregulated)، المأخوذة من *E. coli*، في البندورة، ما نتج من ذلك ثمار ذات محتوى نشاء أعلى بنسبة 20٪. كما أن نسبة الأميلوز الخطي (linear amylose) إلى الأميلوبيكتين (amylopectin) المتشعب هوعامل أساسي في خصائص النشاء المستخدم في الطعام المطبوخ وفي التطبيقات التقنية. لذلك، وفي هذا السياق، أدى التعبير عن جين *glgB* المأخوذ من الـ *E. coli* والمسؤول عن تشكيل رابطة α-1,6 في البطاطا وتحت سيطرة محث سينثاز النشاء المرتبط بالحبيبة (granule-bound starch synthase promoter)، إلى تشكيل نشاء يحتوي على أميلوبكتين أعلى بنسبة 25٪. وبالنسبة إلى تعديل تركيب الأحماض الدهنية في الزيوت النباتية، فقد جرى تنفيذه أيضاً على نحوٍ هام وملموس. فحمض اللوريك (lauric acid) (C12)، هو مادة أولية متجددة هامة في تصنيع مخفضات التوتر السطحي (surfactants) المنحلة في الماء البارد والموجودة فقط في الزيوت الاستوائية (زيت نوى النخيل، زيت جوزة الهند) على شكل ثلاثي الغليسيريد (triglyceride). ولدى كلونة أنزيم ثيوإستراز سلسلة الأحماض الدهنية المحددة الطول ACP المأخوذ من نبات إكليل الغار *Umbellularia californica)* في خطوط مناسبة من اللفت، مكملة بقياسات أخرى، تم الحصول على أصناف من اللفت المحور تحتوي بذوره على 50 mole % من الغليسيرول ثلاثي اللورويل (trilauoyl glycerol). أخيراً، تزيد عالمياً قيمة كمية الأخشاب المنتجة سنوياً عن 400 بليون دولار أميركي. وعلى ضوء تحقيق نمو سريع للأشجار وتخفيف التلوث خلال عملية تصنيع الأوراق، تم إنقاص محتوى اللغنين في الأخشاب عن طريق تعديل جينات مطلوبة في التصنيع الحيوي للغنين، مثلاً، في مسار حمض السيناميك (cinnamic pathway)، بحيث تعتبر الأشجار السريعة النمو ذات الأخشاب القاسية كالحور والأوكاليبتوس (eucalyptus) مركز الاهتمام للبحث في هذا المجال.

التعبير عن المواد الكيميائية القيمة (Expression of valuable chemicals). أجريت معظم هذه التجارب باستخدام نباتات التبغ المحورة وراثياً أو نبتة *Arabidopsis thaliana*، وذلك لأن التحوير الوراثي لهذه الكائنات هو سهل نسبياً. لقد جرى التعبير عن ألبومين المصل البشري مع تحقيق عطاء جيد في إنتاجه؛ وهو ما تم إحرازه أيضاً في عملية إنتاج الأجسام المضادة IgG الكاملة، التي وُجّهت، على ضوء تطوير وسائل مناعية لمنع تسوس الأسنان، نحو *Streptococcus mutans*. في هذه العمليات تم الحصول على تركيز من البروتينات يصل حتى 1٪ من تركيز البروتينات الإجمالي. كما جرى مناقشة التعبير عن المستضدات في النباتات من الناحية الاقتصادية من أجل أن تكون إجراءات تلقيحه رخيصة في البلدان النامية، وذلك بجعل تناول الطعام هو عبارة عن خطوة التلقيح. قادت التجارب النموذجية في التعبير عن المستضد السطحي (surface antigen) لفيروس التهاب الكبد B، (hepatitis B) في أوراق نبات التبغ بنسبة 0,01٪ تقريباً من إجمالي البروتين المنحل، وتغذية الفئران بأغذية مشتقة من نباتات التبغ هذه إلى تحقيق استجابة مناعية لدى الفئران لهذا الفيروس. كما أدى أكل البطاطا المُعبَّر فيها عن السم enterotoxin B غير المستقر حرارياً، وهو بروتين مسبب للإسهال مأخوذ من الـ *E. coli*، إلى استجابة مناعية لدى الأشخاص المتطوعين. من جهةٍ أخرى، عندما تم التعبير عن المشغل الحيوي (operon) من *Rolstonia eutropha* المشفر لتصنيع حمض متعدد الهيدروكسي بيوتريك (polyhydroxybuteric acid) والذي يتألف من ثلاثة جينات، في الصانعة اليخضورية (chloroplast) في الـ *Arabidopsis thaliana* أو في اللفت، أصبح من الممكن إنتاج هذا البولمير القيم من خلال التمثيل الضوئي. في حين لا يزال من المطلوب أمثلة إنتاج النباتات المحتوية على هذه البولميرات من الناحية الاقتصادية أكثر.



النباتات مفاعل حيوي

النبتة	جين غريب/معدل/ معطل	الخصائص الملاحظة	طريقة التحويل
تعديل الجينات الداخلية المنشأ			
اللفت, الصويا	إزالة كبح الأسبارتو كيناز (E.coli) (aspartokinase) وسينثاز حمض الداي هايدرو ديبيكولونيك (dihydrodipicolonic acid symthase) (Corynebacterium)	محتوى أعلى من اللايسين	بلازميد Ti
البطاطا, البندورة	سينثاز النشاء	تركيب نشاء معدّل	تركيب مضاد للتعبير (antisense construct)
اللفت	هيدرولاز أسيل الـACP	سيماء حمض دهون معدّل	بلازميد Ti
أرابيدوبسيس (arabidopsis)	ميثيلاز التوكوفيرول-٧-٧ (tocopherol methylase)	تصنيع الفيتامين E	بلازميد Ti
شجر الصنوبر	سينثاز حمض الشيكيميك	محتوى من الليغنين معدل	تركيب مضاد للتعبير
التعبير عن الجينات الغريبة عن النبتة			**العطاءات [g/kg]**
البطاطا	بروتين غلاف فيروس التهاب الكبد B	استجابة مناعية في الفئران	
	ألبومين المصل البشري	تشكيل ألبومين المصل البشري	
التبغ	شدف الغلوبولين المناعي G المضادة لـ *Streptococcus mutans*	تشكيل شدف أجسام مضادة	10
أرابيدوبسيس, اللفت	3 جينات (مشغل الـ*phb*) من *Ralstonia eutropha*	تشكيل حمض متعدد الهايدروكسي بيوتيريك أو الفاليريك (polyhydroxy valeric)	140

نبتة محورة وراثياً مشغل للـPHV* ← جني الخلاصة ← إسترجاع ← حتى 140g/kg من "البوليمر النباتي"

*PHV: polyhydroxyvalerate

مبادئ علم الأحياء المجهرية

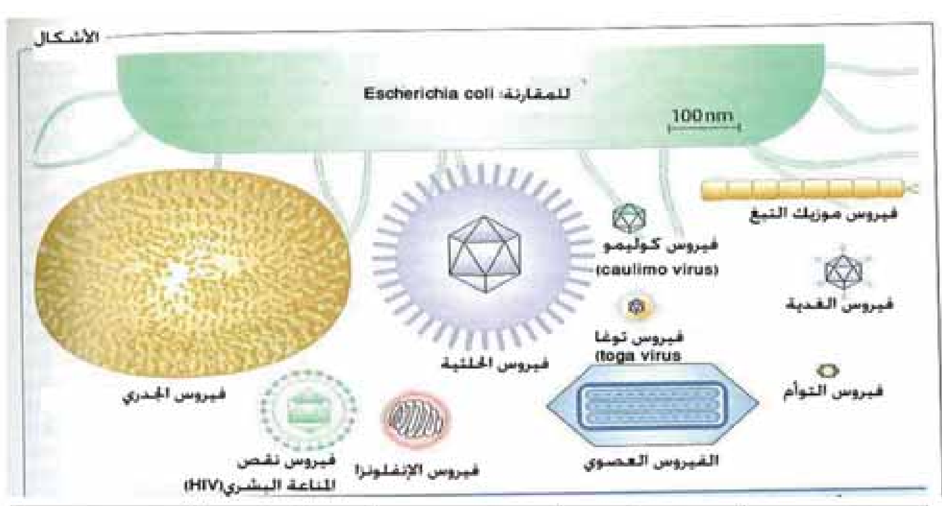
الفيروسات (Viruses)

عموميات (General): الفيروس هو جزيء محدث للإصابة (مُعدي) لا يمكنه الأيض ذاتياً (indigenous metabolism). وبرنامجه الوراثي مقرر إما في DNA أو RNA بحيث يعتمد تضاعفه على مساعدة خلايا المضيف الحية. يتكاثر الفيروس بدفع الخلية المضيفة له على تشكيل غلاف بروتيني (القفيصة (Capsid))، الذي ينتظم مع الحمض النووي الفيروسي (جسيم الفيروس، القفيصة النووية (nucleocapsid)) لتشكل فيروس جديد. يمكن للفيروسات أن تصيب معظم الكائنات الحية؛ وهي في معظمها نوعية (متخصصة) بالمضيف، أو حتى بالنسيج أو الخلية. يتم تصنيف الفيروسات حسب مدى المجموعة المضيفة لها، وحسب شكلها الخارجي (مورفولوجيتها)، والحمض النووي الذي تحتويه /DNA) (RNA، وقفيصتها. وفي التقانة الحيوية، تستعمل الفيروسات لتطوير معطف متخصص أو مكون لقاحي، وأيضاً للحصول على ناقل وراثي وعناصر محضضة تُستَعمل، على سبيل المثال، في مزارع الخلايا الحيوانية وتُدرَس للاستعمال في العلاج الجيني (gene therapy).

فيروسات من أجل التجارب على الحيوان (Viruses for animal experiments): أجريت أولى تجارب كلونة الخلايا الحيوانية عام 1979، باستعمال ناقل (vector) مشتق من الفيروس 40 القردي ((simian virus 40 (SV 40)). هذا الفيروس يمكنه أن يصيب ثدييات مختلفة، ويتكاثر في خلاياها بدورات التحلل (lytic) أو الدورات الاندماجية (المستذيبة) (lysogenic) (التحلل ضد التحلل المؤخر لخلايا المضيف). يبلغ حجم الجينوم الخاص به حوالى 5.2kb، وهو يحتوي على جينات مبكرة لمضاعفة الـ DNA وجينات متأخرة لتصنيع القفيصة (capsid). تحتوي نواقل التعبير المأخوذة من SV40 على نقطة تضاعف (ori)، وعادةً على محضض، وتسلسل إنهاء النسخ (متعدد الأدينين) (transcription termination sequence (polyA)) المشتق من الـ DNA الفيروسي. ومن أجل تحول خلايا الفأر، فإن بنى الـ DNA التي تعتمد على فيروس البابيلوما البقري ((bovin papilloma virus (BPV)) هي المفضلة. هذه البنى تتغير في الخلايا المصابة إلى بلازميدات عديدة النُسَخ لتنتقل إلى الخلايا البنت خلال الانقسام الخلوي. إضافةً إلى ذلك، يجري الآن استكشاف الفيروسات المخففة (attenuated) المشتقة من الفيروسات القهقرية (retroviruses) والغدية (adenoviruses) والحلئية (herpesviruses) كمكوكات جينية (gene shuttles) من أجل العلاج الجيني. إن الفيروسات القهقرية، مثل فيروس نقص المناعة المكتسبة (HIV) تحتوي على جينوم من الـ RNA، وهي تصيب الخلايا المنقسمة فقط، كما تشفر للناسخ العكسي (reverse transcriptase)؛ الذي ينسخ الـ RNA الفيروسي في خلايا المضيف إلى DNA متمم (cDNA) ليُقحم بعدها في جينوم المضيف بحيث يوجه، من خلال محضضات قوية، تشكيل الأحماض النووية الفيروسية وبروتينات القفيصة (capsid). لقد أجريت أكثر من 200 تجربة تحوي خلاً في التضاعف باستخدام نواقل الفيروس القهقري من أجل العلاج الجيني. أما عيوب استعمال هذه النواقل فتقع في قدرتها الصغيرة على احتواء الـ DNA الغريب (المقحم (insert))، في حين تستطيع النواقل المشتقة من الفيروسات الغدية احتواء حتى 28kb من DNA المقحم. لقد استُخدمت النواقل المشتقة من الفيروسات الغدية في حوالى 170 تجربة في العلاج الجيني. وعلى العكس من الفيروسات القهقرية، يمكن للفيروس اللغدي أن يصيب الخلايا غير المنقسمة، إلا أن الـ DNA الخاص به لا يُقحم في DNA صبغيات المضيف. وحيث إن تجربة العلاج الجيني التي تمت باستعمال ناقل فيروس الغدية أدت إلى موت متطوع بعمر 18 عاماً من خلال فرط رد فعل جهازه المناعي، فنادراً ما هي مستعملة هذه الطريقة الآن. أما النواقل المشتقة من الفيروسات الحلئية فتستخدم غالباً بشكلها البسيط في العلاج الجيني الذي يستهدف الخلايا العصبية، مثلاً، في التجارب ذات العلاقة بأمراض الألزهايمر أو الباركنسون. بحيث يسمح جينومها الكبير البالغ 152kb احتواء مقحمات كبيرة من الـ DNA الغريب.

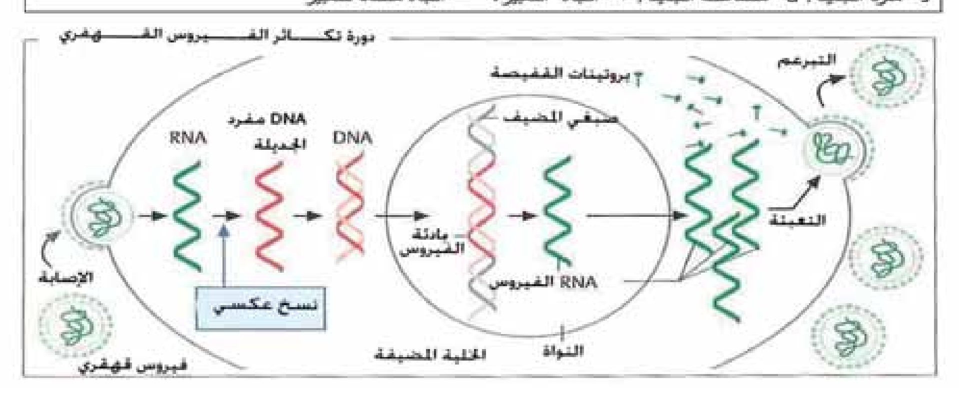
فيروسات من أجل التجارب على النباتات (Viruses for plant experiments): تحتوي معظم الفيروسات النباتية على جينوم من الـ RNA. وهناك فقط مجموعتان من فيروسات الـ DNA تصيب النباتات العليا، وهما فيروسات كوليمو وفيروسات التوائم (gemini). تمتلك فيروسات كوليمو مدىً ضيقاً جداً من المضيفين: يصيب فقط الصلبيات (crucifers) كالشمندر وبعض أصناف الملفوف. وصغر حجم الجينوم فيها يقلل من احتمال تكيفها مع مقحم (insert) غريب. أما فيروسات التوائم فتصيب نباتات زراعية هامة كالذرة والقمح، وبالتالي تحمل مخاطر هامة في التطبيق. أضف إلى ذلك أن جينومها يمر في عمليات إعادة ترتيب وحذف متنوعة خلال دورة الإصابة مما يجعل التعبير الصحيح عن مقحمات الـ DNA الغريبة صعباً.

الفيروسات العصوية (Baculoviruses): وهي تصيب الحشرات لا الثدييات. بعد إصابتها بهذا الفيروس، تشكل خلايا المضيف بروتيناً بلّورياً (البولي هيدرين (Polyhedrin))، الذي يمكن أن يشكل أكثر من 50٪ من حجم الخلية الحشرية. وبذلك فإن محث البولي هيدرين يفيد في التعبير المختلف الأصل (heterologous expression) للبروتينات، باستعمال مزارع الـ Spodoptera (وهي فراشة) الخلوية. تتجلى ميزة هذا النظام في أن إضافة جموعة الغلايكوزيل في تعديلات ما بعد الترجمة (posttranslational glycosylations) تشابه تلك الموجودة في خلايا الثدييات، إلا أن رفع مستوى هذا النظام هو محدود، مما يجعله مفيداً فقط في التجارب المخبرية.



الفيروس	المضيف	المرض	القفيصة	الحمض النووي
الجدري	الإنسان والأبقار	الجدري	معطف (غشاء) معقد	DNA خطي، d
Bالتهاب الكبد	الإنسان	إلتهاب الكبد B	قفيصة بولي هيدريك (polyhydric)	DNA حلقي، d
توغا	الإنسان	الحصبة	قفيصة بولي هيدريك	(+)− RNA، s
الهربس/ الحلأ	الإنسان والطيور	زنار النار، الهربيس (الحلأ)	قفيصة بولي هيدريك	DNA خطي، d
HIV	الإنسان والرئيسيات	متلازمة نقص المناعة المكتسبة (AIDS)	قفيصة دائرية	RNA−(+) ×2
الإنفلونزا	الإنسان والثدييات	الإنفلونزا	معطف حلزوني	RNA−(−) مُقطّع
الغدية	الإنسان	البرد العادي	قفيصة بولي هيدريك	DNA خطي، d
الورم الحليمي (بابيلوما)	الأبقار	الثآليل	قفيصة بولي هيدريك	DNA حلقي، d
موزاييك التبغ	نبات التبغ		قفيصة بولي هيدريك	RNA، s
كوليمو (caulimo)	الملفوف		قفيصة بولي هيدريك	DNA حلقي، s
التوأم	ثنائيات الفلقة		قفيصة مزدوجة البولي هيدرون	DNA حلقي، s
العصوي	الحشرات		قفيصة بولي هيدريك	DNA حلقي، d

s= مفرد الجديلة، d= مضاعف الجديلة، += اتجاه التعبير، − = اتجاه مضاد للتعبير



• العاثيات (Bacteriophages)

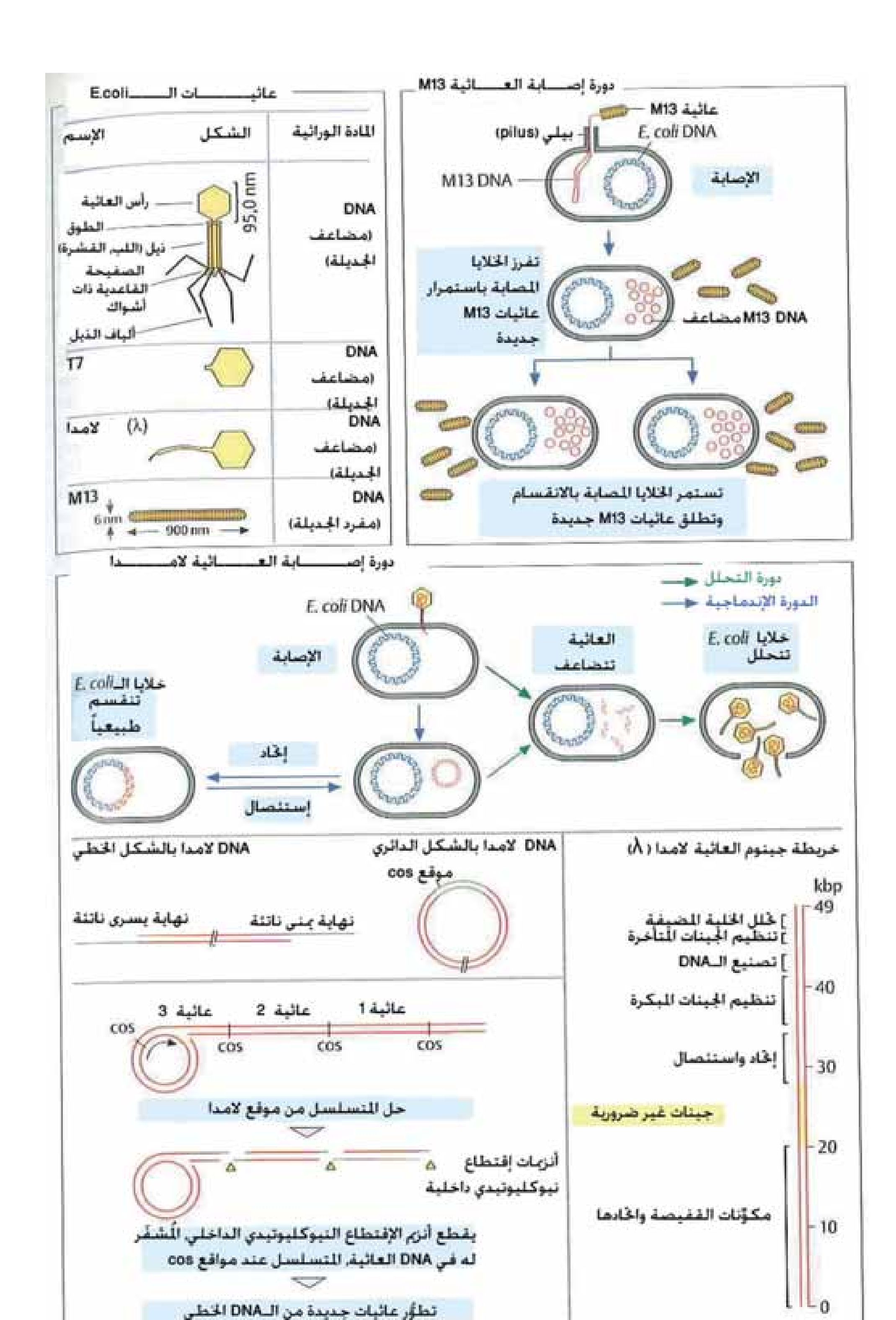
عموميات (General). تسمى الفيروسات التي تهاجم البكتيريا، بعاثيات الجراثيم، وللتبسيط بالعاثيات. هذه الفيروسات هي تهدد باستمرار عمليات التخمير، مثل، عمليات إنتاج الزرعات المستهلة (starter cultures). وكإجراءٍ وقائي، تجرى المحاولات لإنتاج سلالات مقاومة للعاثيات. من جهة أخرى، إن العاثيات هي مفيدة في الهندسة الوراثية، مثلاً، من أجل تطوير نواقل الكلونة (cloning vectors) أو المحثات (promoters)، وكذلك من أجل سلسلة الـ DNA وتحضير مكتبات الجينات والبروتينات. وحيث إن معظم تجارب الكلونة تتم باستخدام الـ *E.coli*، تلعب العاثيات المتخصصة بهذه البكتيريا (عاثيات λ و-M13 و-QB و-T) دوراً مفتاحياً.

العاثية (λ Phage): حين يصيب الـ *E.coli*، يمكن لفيروس العاثية هذا أن يتبع أحد المسارين: إما أن يتكاثر الـ DNA المزدوج الجديلة الخطي (linear doublestrand DNA) الخاص به (حوالى 48.5kbp، أي حوالى 1٪ من جينوم الـ *E.coli*) بصورة مستقلة عن جينوم الـ *E.coli* مسبباً التحلل (دورة التحلل (lytic cycle))، أو أنه يندمج (يُقحم) في جينومها، منتجاً خلايا استذابية ـ اندماجية ـ (lysogenic cells) تحتوي على عاثيات سابقة (prophages) مستترة، بحيث تتكاثر مع البكتيريا على مدى أجيال عدة. ولدى تعرض البكتيريا لإجهادات كارتفاع درجة الحرارة أو التعرض لإشعاعات UV يُستأصل العاثي السابق من جينوم البكتيريا، ويصبح خبيثاً (مؤذياً) بحيث يحلل الخلية المضيفة ويتحرر. تتجلى الصفة الخاصة بالعاثية λ في قدرته على تشكيل نهايات لاصقة أو ناتئة (sticky) ذات 12 نيوكليوتيدات غير مزدوجة (أماكن اللاصقات المسماة بالكوز (cos) اختصاراً لـ cohesive sites) التي هي ضرورية لتشكيل الـ DNA λ الحلقي ولاندماجه في جينوم الـ *E.coli*. كما وأن النهايات الناتئة تشكل إشارة تَعرُّف لتشكيل منتج الجين الفيروسي A وهو أنزيم الاكزونيوكلياز (exonuclease). فبعد تضاعف الـ DNA إلى متسلسل ـ سلاسل متكررة مرتبطة ـ (concatemer) من جينومات الخطية، يقطع أنزيم الإندونيوكلياز A (endonuclease A) عند هذا الموقع وبذلك بادئاً تعبئة الذرية في القفيصة (capsid). أما الكوزميدات (cosmids) فهي أدوات هامة لبناء المكتبات الجينية الضخمة، تشتق من العاثية وهي تُعتبر كعائلة من بلازميدات مثل الذي يمكن أن يُحرَّض برفع الحرارة.

العاثية M13 (M13 phage): وهو يصيب الـ *E.coli* بآلية مختلفة. يحتوي فيروس العاثية M13 على DNA منفرد الجديلة (single-stranded) ذي حجم يبلغ 6.4kb تقريباً، بحيث يوجه، بعد إصابته البكتيريا، تصنيع الجديلة المتممة. هذه الجديلة المزدوجة من الـ DNA لفيروس العاثية، لا تندمج في جينوم الـ *E.coli*، وإنما تتضاعف باستمرار في السيتوبلازم (cytoplasm) لتعطي حتى 1000 جسيم من العاثية في الخلية الواحدة. وخلال انقسام الخلية المضيفة، تنتقل إصابة العاثية إلى الخلايا الابنة (حوالى 100 فيروس في كل خلية). وبذلك يمكن الحصول على الجينات التي تمت كلونتها في ناقل (vector) مشتق من M13 بصورة DNA منفرد الجديلة، وهي صفة هامة في سَلسَلة الـ DNA. كما نفعت نواقل الـ M13، قبل اختراع تفاعل البولميراز التسلسلي (PCR)، في عمليات التطفير الموجه في الموقع للبروتينات.

العاثية T (T phages): وتتواجد في 7 أنواع. بالنسبة إلى الهندسة الوراثية هناك أنزيمان مفيدان يشفر لهما بواسطة جينوم فيروس العاثية T: أنزيم ربط ـ ليغاز ـ الـ DNA (DNA ligase) للفيروس T4، الذي يربط شدفات من الـ DNA بغضّ النظر عن نوعية نهاياتها (ناتئة (sticky) أو غير ناتئة (blunt)) وبولميراز الـ DNA للفيروس T_7، الذي يبلمر (polymerize) الـ DNA على قالب DNA منفرد الجديلة (single stranded)؛ حيث يستعمل في بروتوكولات سَلسَلة الجينات (طريقة Sanger-Coulson). أما محضض (promoter) بولميراز الـ RNA للـ T_7 فيستعمل في عدة نواقل تعبير (expression vectors) مأخوذة من الـ *E.coli* من أجل نسخ الـ DNA إلى RNA، الذي يعمل بدوره كـ RNA رسول (mRNA) في عمليات تصنيع البروتينات بعيداً عن الخلايا (cell-free protein synthesis) وبالاعتماد على mRNA، وtRNA (الـ RNA المترجم)، والرايبوزومات (ribosomes) وATP.

عاثيات لبكتيريا أخرى (Phages of other bacteria): من بين أكثر من 1000 فيروس عاثية تم تصنيفه، هناك أكثر من 300 عاثية متخصص بالبكتيريا المعوية (enterobacteria)، وأكثر من 230 بالبكتيريا المكورة (bacteriococci)، وأكثر من 150 بكل من البكتيريا العصوية (Bacilli) والشعاوات (Actinomycetes). وبنية هؤلاء جميعاً ووظائفها تشبه إلى حد بعيد تلك التي لدى الفيروسات الأخرى، من بينها الفيروسات المتخصصة بالـ *E.coli*. يمكن لبعض هذه العاثيات أن يكون خبيثاً (virulent) أو مستذيباً (lysogenic)، على نحوٍ شبيه بالعاثية λ. إذ تشكل العاثيات المتخصصة بالعصيات اللبِنية (Lactobacilli) مشكلة أساسية في تصنيع منتجات الألبان. لكن السلالات البكتيرية المقاومة تعيق الإصابة بهذه الفيروسات، وذلك عن طريق منع ادمصاصها أو تضاعفها. تستخدم غالباً فيروسات ø105 وSPO2 من بين المجموعات الخمسة لعاثيات الـ Bacillus في تجارب التحويل (transformation)، كما استُخدم الفيروس PBS1 في توصيف خريطة تسلسل جينوم *B. subtilis*. إضافة إلى ذلك، يعتبر الناقل D3112 العاثي الناقل المفضل في تحويل الـ Pseudomonads، وكلاً من SH3 وSH5 وSH10 وøC31 النواقل المفضلة في الهندسة الوراثية للـ Streptomyces.


عائيـــــات الــــــE.coli
الإسم
الشكـل
المادة الوراثية
رأس العائبة
الطوق
ذيل (اللب، القشرة)
الصفيحة القاعدية ذات أشواك
ألياف الذيل
95,0 nm
DNA (مضاعف الجديلة)
T7
DNA (مضاعف الجديلة)
لامدا (λ)
DNA (مضاعف الجديلة)
M13
6 nm
900 nm
DNA (مفرد الجديلة)
دورة إصـــابة العـــائية M13
عائية M13
بيلي (pilus)
E. coli DNA
M13 DNA
الإصابة
تفرز الخلايا المصابة باستمرار عائيات M13 جديدة
مضاعف M13 DNA
تستمر الخلايا المصابة بالانقسام وتطلق عائيات M13 جديدة
دورة إصـــــابة العـــــائية لامـــــدا
دورة التحلل
الدورة الإندماجية
E. coli DNA
الإصابة
العائبة تتضاعف
خلايا E. coli تتحلل
خلايا الــE. coli تنقسم طبيعياً
إتحاد
إستئصال
DNA لامدا بالشكل الخطي
نهاية يسرى ناتئة
نهاية يمنى ناتئة
DNA لامدا بالشكل الدائري
موقع cos
خريطة جينوم العائبة لامدا (λ)
kbp
49
40
30
20
10
0
تحلل الخلية المضيفة
تنظيم الجينات المتأخرة
تصنيع الـDNA
تنظيم الجينات المبكرة
إتحاد واستئصال
جينات غير ضرورية
مكوّنات القفيصة واتحادها
عائية 3
عائية 2
عائية 1
cos
حل المتسلسل من موقع لامدا
أنزيمات إقتطاع نيوكليوتيدي داخلية
يقطع أنزيم الإقتطاع النيوكليوتيدي الداخلي المُشفّر له في DNA العائبة المتسلسل عند مواقع cos
تطوُّر عائبات جديدة من الـDNA الخطي

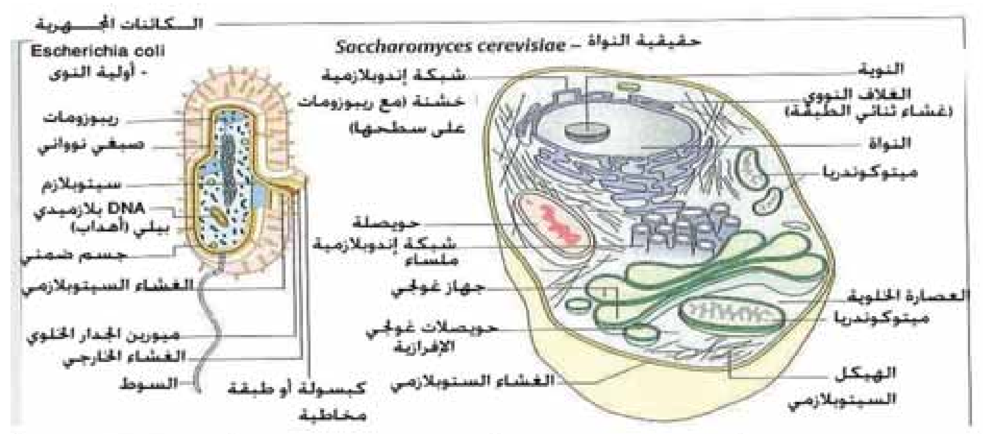
• الكائنات المجهرية (Microorganisms)

عموميات (General). تلعب الكائنات المجهرية دوراً أساسياً في الدورات الكيميائية على الأرض. فهي تساهم في التفكيك الحيوي (biodegradation) للعديد من المركبات؛ التي هي عمليات لا تحصل في البيئة فقط، وإنما في التكافل (symbiosis) مع الكائنات الأخرى (مثلاً، الأشنيات (lichens)، بكتيريا الأمعاء والمعدة). إن بعض الكائنات المجهرية هي طفيليات (parasites) أو ممرضات (pathogens) تفسد صحة أو حياة الكائنات الأخرى. في التقانة الحيوية، تستعمل الكائنات المجهرية غير الممرضة من أجل الحصول على منتجات متنوعة مثل حمض الليمون (citric acid) وحمض الغلوتاميك (glutamic acid)، ومضادات الحيوية (antibiotics)، والكزانثان (xanthan)، والأنزيمات؛ ومن أجل المعالجة الهوائية (aerobic) واللاهوائية (anaerobic) لمياه الفضلات، والرسابة، والتربة والهواء؛ وأيضاً كمضيف لتصنيع البروتينات المأشوبة (recombinant). ونظراً إلى بنيتها وحيدة الخلية (unicellular)، والطرق المتينة المتوفرة لإنشاء وانتقاء طافرات (mutants) فيها، بالإضافة إلى قصر زمن توالدها، فإنها تعتبر كائنات حية نموذجية لفهم الآليات الكيميائية حيوية، والوراثية، والوظيفية (physiological) في الحياة. واعتماداً على اختلافات أساسية يمكن تمييز الكائنات الأولية النوى (prokaryotes) من الكائنات الحقيقية النوى (eukaryotes)؛ بحيث يمكن تقسيم الأولى فرعياً إلى بكتيريا حقيقة (eubacteria) وبكتيريا الأركيا ـ العتائق ـ (archaebacteria) (تضم حوالى 6000 سلالة مختلفة تامة التوصيف).

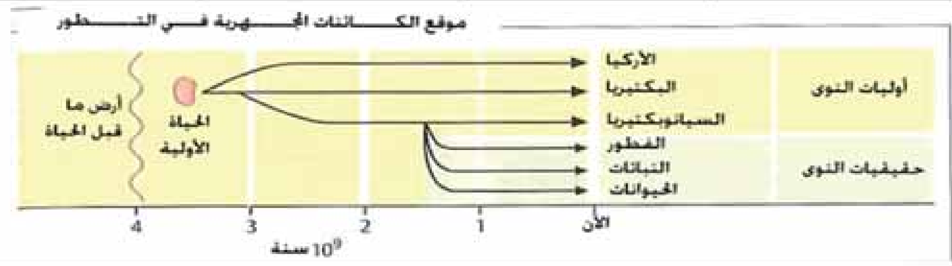
البكتيريا الحقيقية (Eubacteria): هي كائنات حية وحيدة الخلية، تتكاثر بالانقسام الخلوي، يبلغ قطر خلاياها عادةً حوالى 1µm، كما أنها لا تمتلك نواة خلوية بحيث يتشكل DNA الصبغيات لديها على هيئة متشابكة، وهي النوواني (nucleoid). كثيراً ما يوجد جزء من تركيبها الوراثي في وحدات وراثية غير صبغية هي البلازميدات (plasmids)؛ التي تنتقل أفقياً في أغلب الأحيان إلى بكتيريا أخرى ـ وهي آلية مفيدة من وجهة نظر الإنسان لتطوير طرق تفكيك حيوية (biodegradation) للمركبات الغريبة (xenobiotics) في البيئة ومحطات معالجة مياه الصرف، لكنها قدرة شديدة الخطورة بالنسبة إلى تطور المقاومة ضد مضادات الحيوية (antibiotics). أما جدارها الخلوي المكون من البيبتيدوغلايكان (peptidoglycan) فهو أكثر تعقيداً في الكائنات المجهرية سالبة الغرام (gram-nagative)، وغالباً ما يكون مغطى بطبقة لزجة يمكن أن تبرز من خلالها السياط (flagella) التي تؤمن الحركة. وفي السيتوبلازم (cytoplasm) يمكن لمركبات التخزين مثل متعدد الهيدروكسي بيوتيريك (polyhydroxybutyric acid)، أو متعدد الفوسفات (polyphosphate)، أو السيانوفيسين (cyanophycin) أو غيرها أن تودع. تتمتع البكتيريا الحقيقية بإمكانية واسعة لتغيير أشكال الأيض الأساسية، وبالتالي يمكن أن تنمو في مدى مواطن أوسع من تلك التي تستطيع أن تعيش فيها الكائنات الحية العليا. كما أنه كثيراً ما تدهشنا الأنواع عالية التخصص ببروتيناتها وعوامل النمو الفريدة لديها. وعليه، فإن الغشاء الأرجواني للبكتيريا الملحاء (halobacteria) هو وحدة وظيفية فريدة لهذا الجنس، إذ إنه يبدي بعض التشابه مع التمثيل الضوئي (photosynthesis) وكيمياء الرؤية في الكائنات العليا.

بكتيريا الأركيا (Archaebacteria): (العتائق) يعتقد أنها تشابه أشكال الحياة الأقدم على الأرض. وقد كشفت آثارها في التشكلات الجيولوجية (geological) التي تعود إلى مئات ملايين السنين. تعيش هذه البكتيريا في بيئة لا هوائية (anaerobically) غالباً، وهي تمتاز بالنمو عادةً في مساكن حيوية (biotopes) فريدة. أحد الأمثلة عليها هي بكتيريا الميثان (methanobacteria) التي تشكل المجموعة الأهم في جوقة الرسابة (slucge) واختزال حمض الخل (acetic acid) إلى ميثان (methane). تختلف الأركيا عن البكتيريا الحقيقية (eubacteria) في الخصائص البنيوية والوراثية، مثلاً، في بناء الغشاء الخلوي من الدهون الإيثيرية (either lipids) عوضاً عن الدهون الفوسفورية (phospholipids). كما أن وظائف أنزيماتها متأقلمة مع بيئاتها المتطرفة في أغلب الأحيان، وعليه فقد استعملت في التقانة الحيوية. على سبيل المثال، يستخدم غالباً بولميراز الـ DNA، (DNA polymerase) المأخوذ من بكتيريا أعماق البحار *Pyrococcus furiosus* في تفاعلات البولميراز التسلسلي (PCR) بأمانة عالية وخاصة.

الخمائر والفطريات (Yeast and fungi): وهي كائنات حية حقيقية النوى (eukaryotic)، تشكل حتى الآن المجموعة الأكبر من الكائنات المجهرية القابلة للزراعة (cultivatable): هناك حوالى 70000 سلالة مختلفة قد تم تصنيفها. وعلى العكس من أوليات النوى (prokaryotes)، تحتوي الخمائر والفطريات على نواة خلوية، ووحدات فرعية خلوية فعالة وظيفياً، كما أن جدارها مكون من شيتين ـ مادة قرنية ـ chitin) وأحياناً من السيلولوز (cellulose) ومعظمها يعيش هوائياً (aerobically). تقدم التباينات الواسعة في تكاثرها ودورات حياتها، المبادئ الأكثر أهمية في تصنيفها. ويتألف الجسم النامي (vegetative) للفطريات من شبكة شعرية هي الميسيليوم (mycelium) التي يمكن أن تتكاثر جنسياً أو لا جنسياً. يجري التكاثر اللاجنسي عادة بتشكيل أبواغ وأحيانا بالتبرعم. أما التكاثر الجنسي (Phycomycetes) فيتم بواسطة خلايا تناسلية في الفطريات الدنيا، وبواسطة أجسام ثمرية (أكياس زقية)، على شكل كيس (Ascomycetes) أو على شكل صولجان (*Basidiomycetes*) في الفطريات العليا.



	E.coli	S.cerevisiae	للمقارنة: الخلايا النباتية والخلايا الحيوانية
نواة الخلية، العضيات	غير موجودة	موجودة	موجودة
القطر [µm]	1~	10~	100~
الحجم [µm³]	1~	1000~	10000<
التنفس[µL O₂/ mg TS في الساعة]	1000	100	10
زمن التوالد [ساعة]	0.3	1.5	20<
الجينات	4300~	6000~	30000<



الأركيا، البكتيريا الحقيقية، وحقيقيات النوى الدنيا			
	الأركيا	البكتيريا الحقيقية	الفطريات، الخميرة
النوع الخلوي	أولية النواة	أولية النواة	حقيقية النواة
الجدار الخلوي	عديدات سكاريد متغايرة	بيبتيدوغلايكان	غلوكان، شيتين
دهون الغشاء	دهون إيثيرية من وحدت البناء أيزوبرينويد (isoprenoid)	دهون فسفورية	دهون فسفورية
مُبدئ الـtRNA	الميثيونين	فورميل ميثيونين	الميثيونين
المادة الوراثية	صبغي دائري صغير، بلازميدات، بروتينات من نوع الهستون	صبغي دائري صغير، بلازميدات	نواة معقدة تحتوي على أكثر من صبغي واحد بالإضافة إلى DNA خطي وهستونات
بوليمراز الـRNA	معقد	بسيط	معقد
حجم الريبوزومات	70S	70S	80S

● البكتيريا (Bacteria)

عموميات (General). يمكن تصنيف البكتيريا بطرق مورفولوجية (تعتمد على الشكل الخارجي)، وكيميائية حيوية، ووراثية متنوعة، وكذلك تبعاً لاحتياجاتها الغذائية. يحتوي دليل التسمية الدولي للبكتيريا (International Code of Nomenclature of Bacteria (ICNB)) حالياً على 6000 سلالة تقريباً. لكنه يبدو أن تحليل تسلسلات الـ DNA المعزولة من التربة والعائدة للبكتيريا من حيث التصنيف يشير إلى أن عدد الأنواع البكتيرية التي لم تُزرع بعد هي أكبر بكثير.

البكتيريا الحقيقية (Eubacteria): اعتمدت أقدم طرق تصنيف البكتيريا الحقيقية على شكلها الظاهري (morphology). فمن خلال استعمال المجهر الضوئي البسيط يمكن مشاهدة العصيات والمكورات والحلزونيات، والبعض منها مشكلاً تجمعات متعددة الخلايا (خيوط، مستعمرات) مبدياً تفاصيل بنيوية كالأبواغ (spores) أو السياط (flagella). أما التبقيع (staining) فيقدم تبايناً أبعد، وبالتالي يسمح، تبعاً لطريقة H.C.Gram بالتصنيف حسب بنية الجدار الخلوي إلى: بكتيريا موجبة الغرام (gram-positive) تمتلك غشاءً خلوياً واحداً فقط، مغطى بجدار خلوي موريني ثخين، وبكتيريا سالبة الغرام ذات غشائين خلويين يضمان الفراغ المحيط بالغشاء البلازمي (periplasmic space)، حيث يغطي الغشاء الخارجي جداراً خلوياً مورينياً رقيقاً، يمكن أن تبرز منه عديدات السكاريد الدهنية (lipopdysacchaides). كما قادت المعايير الوظيفية والكيميائية الحيوية إلى طرق إضافية في التمييز بين الكائنات المجهرية. ومن الصفات الهامة:

الاستجابة للأكسيجين: يمكن للكائنات المجهرية أن تُقسم فرعياً تبعاً لقابليتها للنمو في الظروف الهوائية (aerobic) واللاهوائية (anaerobic) أو كليهما.

شكل توليد الطاقة: يمكن أن تولد الطاقة بالتمثيل الضوئي (photosynthesis) (ضوئية التغذي (phototroph))، أو بالتنفس، أو بالتخمير (كيميائية التغذي (chemotroph)).

واهبات الالكترون المفضلة: الكائنات المجهرية عضوية الاغتذاء غيرية الاغتذاء (organotrophic) التي تستخدم المركبات العضوية، والكائنات المجهرية جمادية التغذية (lithotrophic) التي تستخدم المركبات غير العضوية مثل H_2، أو NH_3 أو H_2S، أو CO، أو Fe^{2+}.

المصدر الكربوني: تستطيع الكائنات المجهرية ذاتية التغذية (autotrophic) تثبيت الـ CO_2؛ بينما تحصل الكائنات المجهرية الغيرية التغذية على الكربون من المركبات العضوية.

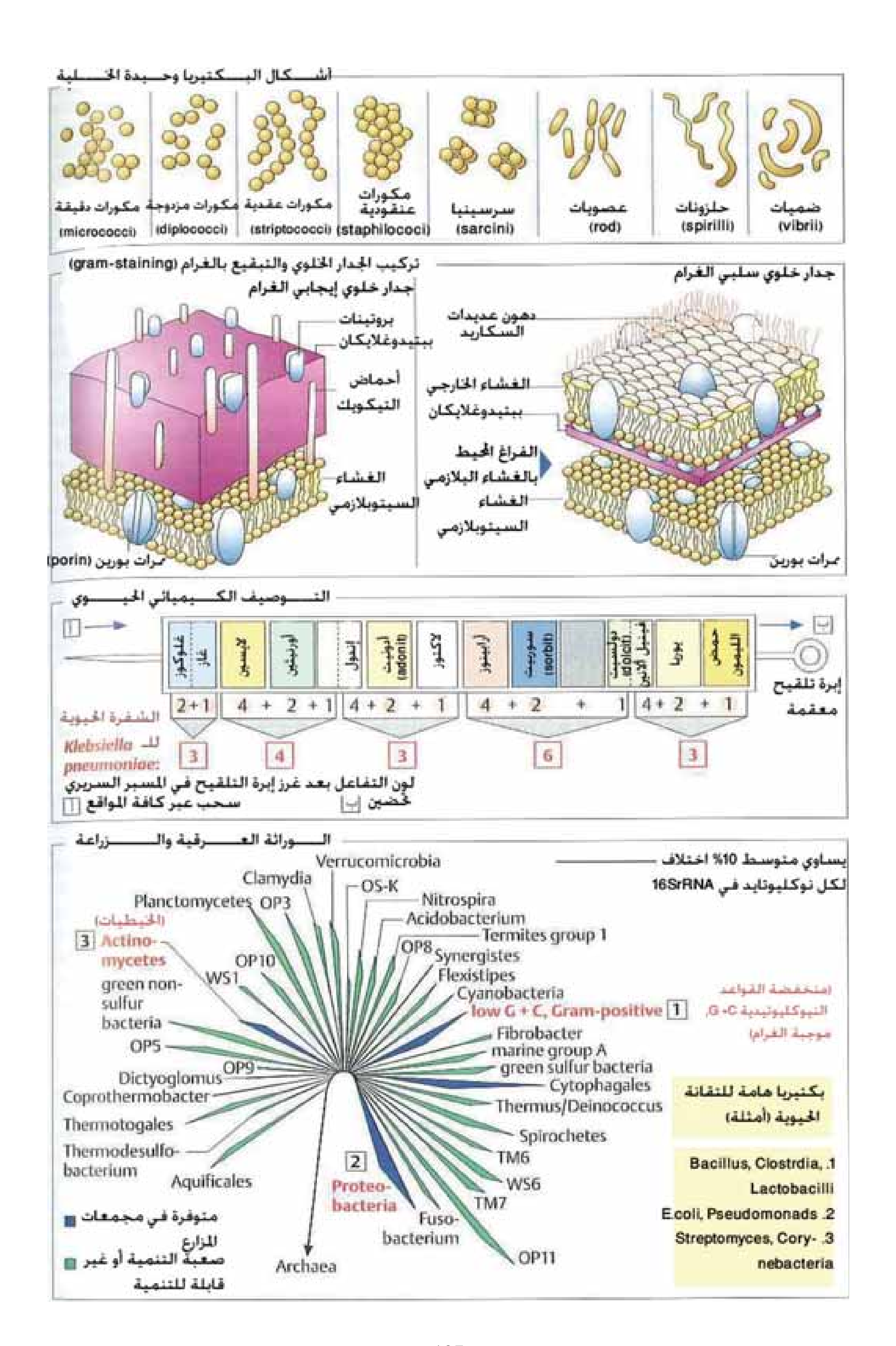
العلاقة مع الأحياء الأخرى: الكائنات المجهرية الرمامية (saprophytic) تكون مستقلة، بينما تعتمد الكائنات المجهرية المتطفلة (parasitic) على كائن مضيف.

تنميط العاثية: يمكن أن تستعمل أيضاً قابلية الإصابة بالعاثية (phage) في التحديد التصنيفي.

التأقلم مع البيئة: تنمو الكائنات المجهرية المحبة للاعتدال (mesophilic) تحت الظروف العادية، أما الكائنات المجهرية المحبة للتطرف (extremophiles) فتتأقلم مع الظروف المتطرفة من الحرارة، أو الضغط، أو الرقم الهيدروجيني (pH)، أو الكهارل ـ الأيونات الكهربائية ـ (electrolytes).

وتشكل الضمنيات الخلوية، والصبغات (pigments)، والمكونات الكيميائية للجدار الخلوي، والغشاء الخلوي (تركيب الأحماض الدهنية)، والتمايز المناعي لسطح الخلية (علم الأمصال (serology))، والحساسية للمضادات الحيوية احتمالات إضافية للتمييز في الشكل الظاهري بين الكائنات المجهرية. كما أصبح التنميط الوراثي للبكتيريا ذا أهمية متزايدة، فعلى سبيل المثال، يمكن محتوى الـ DNA من القواعد النيتروجينية؛ الغوانين والسايتوزين (GC) من التصنيف التقريبي، وتمكن السَلسَلة الكاملة للجينوم الميكروبي من التمييز الأكثر دقة. لقد اكتشفت عام 1972 طريقة مفيدة خاصة للتصنيف، وهي سَلسَلة الـ DNA المشفر للـ RNA الخاص بالوحدات الفرعية 16S و23S الرايبوزومية. فهذا الـ DNA يحتوي على تسلسلات تم الاحتفاظ بها وإلى مدى بعيد خلال التطور، بحيث يطرح تحليل هذه التسلسلات ثلاث عائلات للكائنات الحية: بكتيريا الأركيا ـ العتائق ـ (archaebacteria)، والبكتيريا الحقيقية (أوليات النوى (prockaryotes))، وحقيقيات النوى (eukaryotes).

التوصيف والتصنيف Characterization and taxonomy: إن التعريف التصنيفي السريع للبكتيريا هو مسألة هامة في المستشفيات، والطب البيطري، وإنتاج الغذاء، والصحة البيئية، وكذلك في المختبرات الميكروبية والوراثية. لذلك تستعمل معظم الطرق المذكورة أعلاه مثل المجهر، إجراءات التبقيع، تحديد «دليل السيماء التحليلي «analytical profile index») (API) (اعتماداً على النمو على أوساط مختلفة)، تركيب الأحماض الدهنية للغشاء، أو تحليل الحمض النووي للتسلسلات المتخصصة تصنيفياً بالتشفير للوحدات الفرعية 16S أو 23S للـ RNA الريبوزومي (rRNA). فإذا تم عزل DNA من عينات بيئية، وقورنت التسلسلات المشفرة لـ 16S أو 23S الريبوزومية مع تلك الكائنات المجهرية المودعة في مجموعات المزارع، فإن هناك نسبة أقل من 5٪ تطابق، مما يقترح أن أكثر من 95٪ من إجمالي الكائنات المجهرية المشمولة في هذه العينات لم تتم زراعتها بعد («تحليل ما بعد الجينوم»). في النهاية، يبقى التصنيف الحاسم للكائنات المجهرية في أغلب الأحيان غير عادي، ويتطلب الأخذ بالاعتبار مدىً واسعاً من بيانات التجارب (المعطيات التجريبية)؛ فهو يُجرى عادة من قبل المخابر التي تؤرشف مجموعات المزارع.



أشكال البكتيريا وحيدة الخلية
مكورات دقيقة (micrococci)
مكورات مزدوجة (diplococci)
مكورات عقدية (striptococci)
مكورات عنقودية (staphilococci)
سرسينيا (sarcini)
عصويات (rod)
حلزونات (spirilli)
ضميات (vibrii)
تركيب الجدار الخلوي والتبقيع بالغرام (gram-staining)
جدار خلوي إيجابي الغرام
بروتينات
ببتيدوغلايكان
أحماض التيكويك
الغشاء السيتوبلازمي
مرات بورين (porin)
جدار خلوي سلبي الغرام
دهون عديدات السكاريد
الغشاء الخارجي
ببتيدوغلايكان
الفراغ المحيط بالغشاء البلازمي
الغشاء السيتوبلازمي
مرات بورين
التوصيف الكيميائي الحيوي
إبرة تلقيح معقمة
الشفرة الحيوية للـ Klebsiella pneumoniae:
لون التفاعل بعد غرز إبرة التلقيح في المسبر السريري
سحب عبر كافة المواقع
تحضين
الوراثة العرقية والزراعة
يساوي متوسط 10% اختلاف لكل نوكليوتايد في 16SrRNA
Verrucomicrobia
Clamydia
OS-K
Planctomycetes
OP3
Nitrospira
Acidobacterium
Termites group 1
(الخيطيات)
Actinomycetes
OP10
OP8
Synergistes
Flexistipes
WS1
green non-sulfur bacteria
Cyanobacteria
low G + C, Gram-positive
(منخفضة القواعد النيوكليوتيدية G+C، موجبة الغرام)
Fibrobacter
marine group A
OP5
OP9
green sulfur bacteria
Dictyoglomus
Cytophagales
Coprothermobacter
Thermus/Deinococcus
بكتيريا هامة للتقانة الحيوية (أمثلة)
Thermotogales
Spirochetes
Thermodesulfobacterium
TM6
Aquificales
Proteobacteria
WS6
TM7
Fusobacterium
Archaea
OP11
متوفرة في مجمعات المزارع
صعبة التنمية أو غير قابلة للتنمية
1. Bacillus, Clostrdia, Lactobacilli
2. E.coli, Pseudomonads
3. Streptomyces, Corynebacteria

• بعض البكتيريا المهمة في التقانة الحيوية

(Some bacteria of importance for biotechnology)

عموميات (General). هناك بعض البكتيريا ذات أهمية مميزة في التقانة الحيوية، ومثالها: *Escherichia coli* *Pseudomonas putida, Bacillus subtilis, Streptomyces coelicolor*، و *Corynebacterium glutamicum*.

Escherichia coli: وهي بكتيريا رمامية (saprophyte)، توجد في الأمعاء الغليظة للثديات، تنتمي إلى مجموعة البكتيريا المعوية (Enterobacteriaceae)، وذات شكل عصوي يحمل سياطاً (flagellum). يُبقَّع (stnained) جدارها الخلوي تبقيعاً سلبي الغرام (gram negative): وهو يشمل غشاءين بينهما الفراغ المحيط بالغشاء البلازمي (periplasmic space). وتحت شروط النمو اللاهوائي (anaerobic)، تولد الـ E.coli الطاقة عن طريق التخمير، كما وتشكل أحماضاً. أما بوجود الأكسيجين فتؤمن الطاقة من خلال السلسلة التنفسية (respiratory chain). يبلغ زمن تضاعفها بالشروط المثالية حوالى 20 دقيقة، ويبلغ حجم جينومها حوالى 46Mbp، ونسبة محتواه من الغوانين والسايتوزين (G+C) 51٪. وعلى الرغم من اعتبارها من بين أكثر الكائنات المجهرية المفهومة حيث تمت سلسلة جينومها كاملاً، إلا أنها لا تزال وظيفية أكثر من ثلث نواتجه الجينية غير مفهومة تماماً. في التقانة الحيوية، تستعمل الـ *E.coli* ككائن مضيف في التعبير عن البروتينات غير المضاف إليها مجموعة الغلايكوزيل (nonglycosylated)، مثلاً، الإنسولين، وهرمون النمو، وشدفات الأجسام المضادة. ولأنها تنمو في أمعاء الإنسان الغليظة، فإنها تصنف في مجموعة الأمان S2؛ ونتيجة لذلك تستعمل سلالات E.coli المخففة (attenuated)، حيث تلغي كافة عوامل الخطورة، ويمكن أن يتم تداولها بشروط الأمان الأحيائية المجهرية العادية كمجموعة الكائنات المجهرية S1 (مثلاً، *E.coli K12*). وكذلك أيضاً تستعمل الـ *E.coli* في تجارب الكلونة (cloning)، بحيث طورت نواقل بلازميدية (plasmid vector) مختلفة لكلونة جينات غريبة فيها، مثلاً، الناقل المكلونِ BAC المستعمل لبناء مكتبات جينية.

Pseudomonas putida: وهي عصيات هوائية (aerobic rod) لها أسياط (flagella) قطبية تعيش هوائياً في الماء. يحتوي جدارها الخلوي على غشاءين بينهما الفراغ المحيط بالغشاء البلازمي، وهو يُبقَّع (stained) تبقيعاً سلبي الغرام. يبلغ حجم جينومها 6.1Mbp ونسبة الغوانين والسايتوزين (G+C) فيه 61٪. تتمتع الـ Pseudomonads بإمكانية وراثية واسع لتحطيم المركبات العطرية (aromatic compounds)، التي يمكن نقلها أفقياً من خلال البلازميدات (plasmids). وفي التقانة الحيوية، تستعمل هذه البكتيريا بشكلٍ مسيطر في الدراسات البيئية.

Bacillus subtilis: وهي عصيات دون سياط(flagellum)، تعيش هوائياً في التربة وفي الظروف غير الملائمة تشكل أبواغاً ساكنة (dormant spores) مقاومة للحرارة. يُبقَّع (stained) جدارها الخلوي تبقيعاً إيجابي الغرام، ويشتمل على غشاء واحد فقط. تولد هذه البكتيريا الطاقة من خلال سلسلة نقل الإلكترونات (electron transport chain). يبلغ زمن تضاعفها تحت ظروف النمو المثالية حوالى20 دقيقة، ويبلغ حجم جينومها حوالى 4.2Mbp، كما تمت سلسلته كاملاً حيث إن نسبة محتواه من الغوانين والسايتوزين (G+C) تبلغ 44٪. في التقانة الحيوية، تعتبر *B.subtilis* الكائن الحي المفضل لإنتاج الأنزيمات الخارج خلوية، مثل، البروتياز (proteases) والأميلاز (amylases).

Streptomyces coelicolor: هي بكتيريا أخرى تعيش في التربة تتبع لجنس الـ Actinomycetes، تتكاثر على شكل خيوط بكتيرية متشابكة ـ ميسيليوم ـ (mycelium) لتشكل خيوط بكتيرية ـ غصينات ـ (hyphae) هوائية تتكون عليها الغبيرة ـ الكونيديا ـ (conidia) المشكلة للأبواغ (spores)، يُبَقَّع (stained) جدارها الخلوي تبقيعاً إيجابي الغرام (gram positive) ويشتمل على غشاء واحد فقط. وكمعظم سلالات الـ Streptomyces تحطم *S.coelicolor* السليلوز (cellulose) والشيتين (chitin). لقد تمت سَلسَلة جينومها الخطي (linear) الضخم بشكل كامل، البالغ حجمه 8.7Mbp أي ما يقارب ضعف حجم الـ *E.coli*؛ مع نسبة 72٪ غوانين وسايتوزين (G+C). يتضمن هذا الجينوم حوالى الـ 8000 جين بنائي (structural gene) التي تشفر بشكلٍ رئيسي للأنزيمات المطلوبة لتشكيل المستقلبات الثانوية (secondary metabolites) مثل مضادات الحيوية.

Corynebacterium glutamicum: وهي أحد أفراد بكتيريا الـ coryneform التي تنمو في العديد من المواطن، وتشمل أنواعاً ممرضة (pathogenic) مثل *C.diphteriae*. تنمو خلايا الـ coryneform الصولجانية (club) الشكل هوائياً، وتُبَقَّع إيجابياً بالغرام (gram positive). كما يبلغ حجم جينوم *C.glutamicum* حوالى 3.1Mbp الذي تمت سَلسَلته كاملاً، الذي يحتوي على نسبة 56٪ غوانين وسايتوزين (G+C). أما الطافرات اللاتنظيمية من الـ *C.glutamicum* فتُعتبر سلالات هامة لإنتاج الـ L-.glutamic والـ L-lysin.

سَلسَلة الجينوم (Genome sequencing): إضافة إلى الكائنات الحية المذكورة أعلاه، تمت سَلسَلة جينومات أكثر من 50 بكتيريا، التي تضم كثيراً من الممرضات مثل *Helicobacter pylori, Mycobacterium tuberculosis, Neisseria meningitides, Streptococcus pneumonia, Vibrio cholera, Treponema palladium*، و *Yersinia pestis* وكثيراً من الأركيا (archae). عند نهاية 2002 تم إنهاء سلسلة 73 جينوماً ميكروبياً، كما أن السَلسَلة جارية لـ 140 جينوماً آخر، ما يقدم قاعدة بيانات هائلة للجينومات الميكروبية المقارنة وللتحليل الوظيفي (www.tigro.org).

بعض البكتيريا الهامة في التقانة الحيوية

1 *Escherichia coli*
2 *Pseudomonas putida*
3 *Bacillus subtilis* (تفرخ من بوغة)
4 *Corynebacterium glutamicum*
5 *Streptomyces coelicolor* (مع كونيديا)

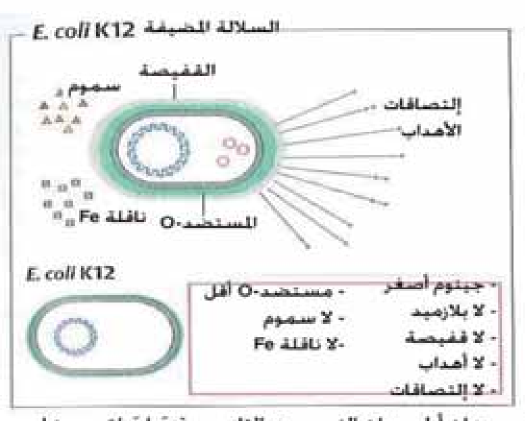
	1	2	3	4	5
تشكل السوط	+	+	–	–	–
التبقيع بالغرام	–	–	+	+	+
تشكيل الأبواغ	–	–	+	–	+
النمو هوائياً	+	+	+	+	+
محتوى G+C	51	61	44	56	72
حجم الجينوم (Mbp)	4,6*	4,2	4,2*	3,1*	8,7*

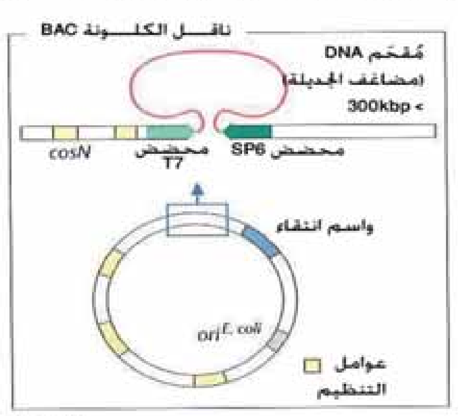
*سلسلة الجينوم تمت كاملة

بروتينات عرفت في *E.coli* K12

الإجمالي	4288	غير مُصنّف أو غير معروف	1632
الناقلة، بروتينات الإرتباط	288	بروتينات تنظيمية مفترضة	133
ناقلات مفترضة	146	لمضاعفة الـDNA والتعديل	115
أنزيمات مفترضة	251	للعوامل المساعد أو مجموعات الجراحة الترقيعية	103
لأيض الطاقة	243	عاثيات، ترانسبوسونات، بلازميدات	87
للتكيف، والدفاع	188	لتصنيع النوكليوتيدات وهدمها	58
للأيض الوسيطي المركزي	188	للنسخ وتصنيع الـ RNA	55
لوحدات البناء البنيوية	182	للأحماض الدهنية والدهون الفوسفورية	48
لوحدات بناء بنيوية مفترضة	42	ذات وظيفة تنظمية	45
للترجمة وتعديلات ما بعد الترجمة	182	نواتج جينية متنوعة	26
لصنيع الأحماض الأمينية حيوياً وهدمها	131	بروتينات أغشية مفترضة	13
لهدم الكربون	130	شابيرونات (chaperones) مفترضة	9

*فوراً بعد إتمام السلسلة، عام 1997. ومنذ ذلك الحين، توضحت وظائف جينات أكثر





بعض جينومات أوليات النوى التامة سلسلتها

	المرض	حجم الجينوم (Mbp)
Haemophilus influenzae	التهاب سحايا الأطفال	1,8
Helicobacter pylori	القرحة	1,7
Mycoplasma pneumoniae	إلتهاب الرئة البكتيري	0,8
Mycobacterium tuberculosis	السل الرئوي	4,4
Treponema pallidum	الزهري	1,1
Mycobacterium leprae	الجذام	3,3

• الفطريات (Fungi)

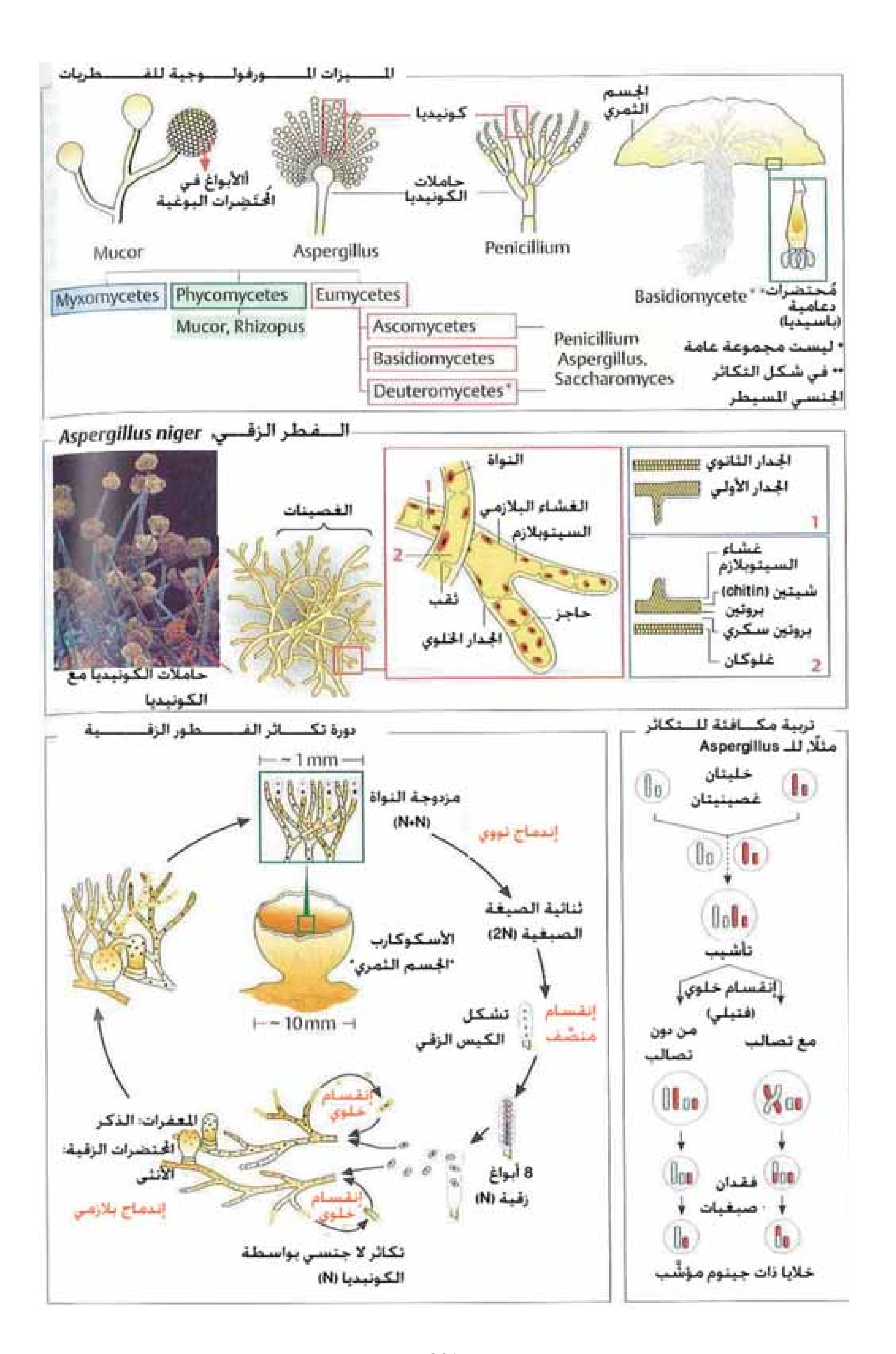
عموميات (General). تلعب الفطريات دوراً أساسياً في هدم (catabolism) مركبات الكربون في الغلاف الحيوي، مثلاً، في تحلل الأخشاب وتشكل أحماض الهيوميك (humic acids). تترافق الفطريات الجذرية (Mycorrhizal fungi) مع جذور النباتات وتساعد على امتصاص المغذيات، لكن فطريات أخرى مثل الأعفان هي ممرضات نباتية خطرة. تمتلك الفطريات دوراً هاماً في التقانة الحيوية، ليس فقط في إفساد الغذاء، ولكن أيضاً في تحضير المنتجات الغذائية المخمرة، بالإضافة إلى إنتاج مضادات حيوية (antibiotics) أو أنزيمات قيمة من قبل بعض الفطريات. من بين 70,000 نوع فطري جرى تصنيفه، تضم الـ Ascomycetes 20,000 نوع، وبذلك فهي المجموعة الفرعية الأكبر، التي تشتمل على الـ *Penicillium notatum* والـ *Aspergillus niger*. أما من بين الفطريات الدنيا (Zygomycetes)، فإن أنواعاً مثل Rhizopus وMucor تمتلك الأهمية الكبرى في التقانة الحيوية. هناك بعض من الـ 12,000 من فطريات المشروم (Basidiomycetes) قابلة للأكل (مثلاً، champignons، shiitake، chanterelles، ceps)، وأخرى تساهم في تحلل الأخشاب (فطريات العفن الأبيض والأحمر). كما أن هناك حوالى 300 نوع من الفطريات الممرضة للإنسان. إن جميع الفطريات تمتاز بالعيش بطريقة غيرية التغذية (heterotrophically) وبتركيب جدار خلوي من الشيتين (chitin) والغلوكان (glucans).

أشكال: يتبع تكاثر الفطريات أنماطاً متنوعة للغاية، التي تم وصفها هنا باستخدام الـ Ascomycetes كمثال. تتألف الكتلة الخلوية (الثالوس (thallus)) من خيوط فطرية متشابكة ـ الميسيليوم ـ (mycelium) مشكلة من الغصينات (hyphae). وخلال التكاثر اللاجنسي تنقسم حوامل الغبيرات (conidiophores)، التي تتكون على قمة الميسيليوم، وتشكل الأبواغ (spores) (الغبيرات (conidia))، وهي بدورها تنمو لتعطي ميسيليوماً جديدة. وكمعظم الفطريات، يمكن للـ Ascomycetes أن تتكاثر جنسياً لينتج من ذلك أنماط ظاهرية (phenotypes) مختلفة (ازدواج الشكل (dimorphism)). في هذه الحالة تشكل الغصينات (الخيوط الفطرية) أعضاء جنسية ذكرية وأنثوية (المعفرات والمحتضِرات الزقية، تندمجان خلال الاندماج البلازمي (plasmogamy) إلى غصينات مزدوجة النواة (dikaryotic)، وتتطور فيما بعد لتشكل «الجسم الثمري» ـ الأسكوكارب ـ (ascocarp). بعد ذلك، تندمج النواتان في الخلايا الطرفية مزدوجة النواة لتشكِّل الزيجوت (zygote)) الاندماج النووي (karyogamy))، ثم يحول الانقسام المنصف (meiosis) هذا الزيجوت إلى ثمانية أبواغ زقية أحادية الصيغة الصبغية (haploid ascospores) (أو إلى 4 أبواغ دعامية (basidiospores) في حالة الـ Basidiomycetes)، التي تنمو ثانية لتشكل الميسيليوم.

Penicillium notatum: وهي تنمو على هيئة خيوط فطرية متشابكة ـ ميسيليوم ـ (mycelium) تشكل أجساماً ثمرية تطلق أبواغاً (الغبيرات (conidia)) من أجل التكاثر اللاجنسي. توصف الفطريات مثل الـ Penicillium التي فقدت القدرة على التكاثر الجنسي بالفطريات الناقصة *Fungi imperfecti*، وبالتالي إذا كان التأشيب (recombination) مطلوباً خلال التربية (breeding) المخبرية، فإنه يجب استخدام اندماج الحبلات المجردة (protoplast fusion) من بين أنواع مختلفة من النوى (تغاير النوى (heterokaryosis)). إن الفطر *P.notatum* والفطر المشابه *Acremonium chrysogenium* هما كائنات حية صناعية هامة لأنهما يصنعان مضادات اللاكتام الحيوية(lactam antibiotics). كما أن أنواعاً أخرى من الـ Penicillium مثل *Penicillium camembertii* لها دور هام في إنضاج الجبن. أما الـ *P.notatum* فتمتلك جينوماً يبلغ حجمه 32Mbp حيث تمت سلسلته إلى حد ضئيل فقط.

Aspergillus nidulans: وتختلف عن الـ Penicillium في شكل الغبيرات (cinidia) لديها. يحتوي الجينوم الخاص بها على 12.6Mbp، وعلى الرغم من أن سلسلته قد أنجزت، إلا أن النتائج غير متاحة للعموم حتى الآن. تستعمل *A.oryzae* في الإنتاج الصناعي للأنزيمات الخارج خلوية، وهي الكائن الحي المضيف المفضل لإنتاج الأنزيمات المأشوبة (recombinant) من حقيقيات النواة (eukaryotes) الأخرى. كما تلعب سلالات أخرى من الـ Aspergillus دوراً تقليدياً في البلدان الآسيوية لتصنيع منتجات غذائية مثل صلصة الصويا، والـ miso، والساكي (sake)، إضافةً إلى استعمالها لإنتاج أنزيمات خارج خلوية مثل البروتياز (proteases) والأميلاز (amylases). أما الـ *A.niger* فتعتبر الكائن الحي المفضل لإنتاج حمض الليمون (cetric acid) وحمض الغلوكونيك (gluconic acid). وعلى نحوٍ مشابه بسلالات الـ Penicillium يعتمد تحسين سلالاتٍ الـ Aspergillus غالباً على اندماج الحبلات المجردة (protplast) والانتقاء.

Rhizopus oryzae: وهي من فطريات الـ Zygomycetes، تنمو على الأرز، ويمثل فطر الـ *R.nigricans* عفن الخبز الأسود. تنمو غصينات ـ الخيوط الفطرية ـ (hyphae) هذا الفطر بسرعة، وهي تقوم بحفر طريقها خلال الوسط عبر مركبها الأولي (substrate). أما تكاثرها اللاجنسي فيجري عن طريق تكوين أبواغ (spores) على الخيوط الفطرية المتشابكة ـ الميسيليوم ـ (mycelium) المتمايزة (الـ sporangia). يمكن للـ rhizopus وأشكال الـ mucor المشابهة أن تنمو على المواد العضوية المتحللة، وأن تصنع عدداً كبيراً من أنزيمات التحلل ـ الهيدرولاز ـ (hydrolases) الخارج خلوية لهذا الهدف، ونتيجة لذلك أصبحت هذه الفطور كائنات حية هامة لتصنيع الأنزيمات الخارج خلوية. في حين بقي تسلسل جينوم الـ *R.oryzae* غير مدروس تماماً.


الميزات المورفولوجية للفطريات
الجسم الثمري
كونيديا
حاملات الكونيديا
الأبواغ في المُحتضِرات البوغية
Mucor
Aspergillus
Penicillium
Basidiomycete*
مُحتضرات** دعامية (باسيديا)
Myxomycetes
Phycomycetes
Eumycetes
Mucor, Rhizopus
Ascomycetes
Basidiomycetes
Deuteromycetes*
Penicillium
Aspergillus,
Saccharomyces
* ليست مجموعة عامة
** في شكل التكاثر الجنسي المسيطر
الفطر الزقي Aspergillus niger
الغصينات
النواة
الغشاء البلازمي
السيتوبلازم
ثقب
حاجز
الجدار الخلوي
الجدار الثانوي
الجدار الأولي
غشاء السيتوبلازم
شيتين (chitin)
بروتين
بروتين سكري
غلوكان
حاملات الكونيديا مع الكونيديا
دورة تكاثر الفطور الزقية
~ 1 mm
مزدوجة النواة (N+N)
إندماج نووي
ثنائية الصيغة الصيغية (2N)
الأسكوكارب "الجسم الثمري"
~ 10 mm
تشكل الكيس الزقي
إنقسام منصّف
8 أبواغ زقية (N)
المعفرات: الذكر
المحتضرات الزقية: الأنثى
إندماج بلازمي
إنقسام خلوي
تكاثر لا جنسي بواسطة الكونيديا (N)
تربية مكافئة للتكاثر مثلًا للـ Aspergillus
خليتان غصينيتان
تأشيب
إنقسام خلوي (فتيلي)
من دون تصالب
مع تصالب
فقدان صبغيات
خلايا ذات جينوم مؤشّب

• الخمائر (Yeasts)

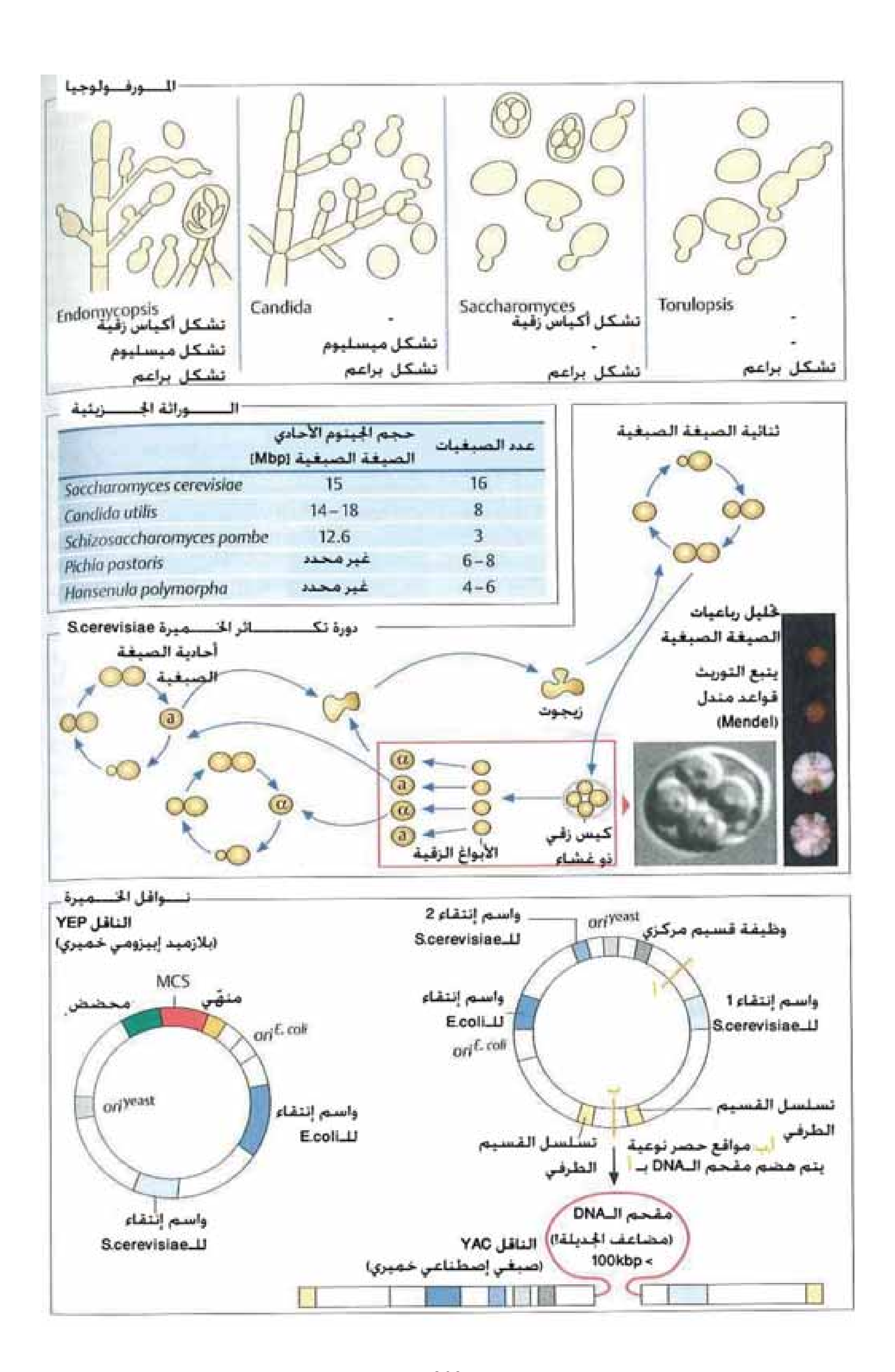
عموميات (General). إن الخمائر هي مجموعة فرعية من الـ Ascomycetes. ولأنها تتكاثر بالتبرعم (budding)، فهي تسمى أيضاً بالفطريات المتبرعمة. تنمو الخمائر بطريقة غيرية التغذي (heterotrophic)، مع تفضيلها الأوساط الحامضية (5- 3.5 pH). وهي لا تشكل في العادة الخيوط الفطرية المتشابكة ـ الميسيليوم ـ (mycelium)، كما يتركب جدارها الخلوي من الشيتين (chitin). تضم الخمائر الهامة في التقانة الحيوية *Sacharomyces cerevisiae*، Candida utilis، Candida albican، Schizosaccharmoyces pombe، و Hansenula polymorpha، و *Pichia pastoris*.

Saccharomyces cerevisiae: (مرادفاتها: خميرة الخباز، خميرة البيرة، الخميرة) يمكنها أن تتكاثر إما بالصيغة الصبغية الأحادية (haploid) أو الثنائية (diploid)، وبالتالي فهي تقدم كائناً حياً ممتازاً للأبحاث الوراثية. تتبع السلالات المخبرية الأحادية الصيغة الصبغية واحداً من اثنين من أنماط التزاوج (MATα أو MATa)، وهي يمكن أن تتزاوج تبادلياً (reciprocally) فقط. فالتكاثر اللاجنسي يجري عن طريق تشكيل الغبيرات ـ الكونيديا ـ (conidia) متبوعة بهجرة إما النواة الأحادية أو الثنائية الصيغة الصبغية. أما التكاثر الجنسي فيحدث عند اندماج خليتين تناسليتين (gametes) أحاديتي الصيغة الصبغية، متبوعاً بالانقسام المنصف (meiosis) لتشكيل أربعة أبواغ زقية (ascospores) أحادية الصيغة الصبغية، التي يمكن ملاحظة نمطها الظاهري (phenotype) بصورة منفصلة، مما يسمح بتحليل وراثي بسيط للصفات الملاحظة (تحليل الرباعيات (tetrads)). ونظراً إلى كون عملية زرع خلايا الصيغتين الصبغيتين الأحادية والثنائية بسيطةً، وتوفر التسلسل التام للجينوم (12Mbp على 16 صبغياً)، وغياب الأنترونات (introns)، وقصر زمن التضاعف (90 دقيقة)، أصبحت *S.cerevisiae* الكائن الحي النموذج المفضل في الوراثة الجزيئية (molecular genetics) لحقيقيات النوى (eukaryotes) البسيطة. والميزة الأخرى التي لدى الخميرة أنها تحتوي على بلازميد (plasmid) طبيعي يدعى 2μm (60 ـ 100 نسخة في النواة الخلوية)، وأنه يتوفر أيضاً عنصر إضافي لصبغي (extrachromosomal element) ثانٍ، وهو الفريون القاتل (virion)، من أجل تجارب التأشيب (recombination experiments). لقد طورت نواقل كلونة (cloning vectors) عديدة لتحويل (transformation) الخميرة، وهي إما أن تسمح بتضاعف الجينات الغريبة خارج صبغي الخميرة (YRP= بلازميدات الخميرة المتضاعفة (yeast replicating plasmids) أو YEP= بلازميدات الخميرة الإيبيزومية (yeast episomal plasmid) أو بدمج الجين الغريب في الصبغي (YIP= بلازميدات الخميرة المندمجة (yeast integrating plasmid)). أما صبغيات الخميرة الاصطناعية (YAC= الصبغيات الاصطناعية الخميرية (yeast artificial chromosome)) فتسمح بكلونة شدفات كبيرة من الـ DNA بحجم 600-1400Kbp؛ وهي قد استعملت كثيراً لتحضير مكتبات الجينومات، لكنها تميل إلى إعادة الالتحام، ولذلك تم استبدالها بالـ BACs غالباً. تبدي جينات الخميرة، التي تبلغ حوالى 6000 جين موزعة على 16 صبغياً خطياً (linear chromosome)، في أغلب الأحيان تجانساً مدهشاً وكبيراً مع الجينات البشرية. لذا فقد نفعت الخميرة وإلى مدى بعيد كنظام نموذجي بسيط للدراسات الأيضية والتنظيمية. وفي مجال التقانة الحيوية، تستعمل الخميرة في تحضير كثير من المنتجات الغذائية كالبيرة والنبيذ والخبز، كما تستعمل في إنتاج الإيثانول الصناعي. إضافةً إلى ذلك، أصبحت الخميرة المأشوبة مضيفاً هاماً لتصنيع منتجات كالإنسولين، والأنترفيرون، واللقاحات (vaccines) (مثل المستضدات السطحية لالتهاب الكبد B). وعلى خلاف الـ *E.coli* فإن الخميرة ككائن مضيف تسمح بتعديلات مابعد الترجمة (posttranslational modifications) للنواتج الجينية، وخاصةً لناحية إضافة الغلايكوزيل (glycosylation).

Candida utilis: تختلف عن الـ Saccharomyces بتشكيلها للميسيليوم ـ هيئات من الخيوط المتشابكة ـ (mycelium)، لكنها تتكاثر لا جنسياً، من خلال البرعمة (budding) فحسب. تظهر بعض جيناتها استعمالاً غير قويم للشيفرة (مثلاً تشفر لـ CUG بسيرين (serine) بدلاً من الليوسين (leucine)) مما يعيق من تعبيرها المتغاير الأصل (heterologous expression). لقد استعملت سلالات الـ candida في التقانة الحيوية لإنتاج أنزيمات خارج خلوية وتوليد كتلة حيوية قابلة للهضم. وهي يمكنها أن تنمو باستخدام مركبات أولية (substrates) غير تقليدية مثل صابون السلفايت (sulfite suds) أو وحدات الألكان (alkane). كما أن هناك بعضاً من سلالاتها هي ممرضة للإنسان مثل *C.albicans*.

Pichia pastoris and Hansenula polymorpha: كلاهما خميرتان من نوع ميثيليات التغذية (methylotrophic) التي يمكن أن تنموا على الميثانول كمصدر وحيد للكربون. وقد عزلتا ودرستا في سياق تصنيع البروتين من الخلايا المنفردة (single-cell proteins)، كما وتستعملان اليوم ككائنات حية مضيفة جذابة في تجارب الكلونة. وعليه، فإن بروتينات متنوعة مثل الليباز (lipases)، بيتا ـ إنترفيرون (β- interferon) وشدفات الأجسام المضادة جرى التعبير عنها بشكلٍ فعال وظيفياً في *P.pastoris* بعطاء عدة غرامات من المنتج المأشوب لكل ليتر من مرق (broth) المزرعة.

Schizosaccharomyces pombe: عزلت لأول مرة من بيرة شرق أفريقية (سواحلي: بومبي (pombe)، بيرة). لقد تمت سَلسَلة جينوم الـ Ascomycetes بشكلٍ كامل، وهو يحتوي 12.6Mbp مشابهاً لجينوم *S.cerevisiae*. وتتوزع جيناته البالغة حوالى 5400 جين على ثلاثة صبغيات فقط.



	حجم الجينوم الأحادي الصيغة الصبغية [Mbp]	عدد الصبغيات
Saccharomyces cerevisiae	15	16
Candida utilis	14–18	8
Schizosaccharomyces pombe	12.6	3
Pichia pastoris	غير محدد	6–8
Hansenula polymorpha	غير محدد	4–6

• الكائنات المجهرية: العزل، الحفظ، الأمان

(Microorganisms: isolation, preservation, safety)

عموميات (General). تستعمل الزرعات النقية في معظم تجارب الكائنات المجهرية. وفي التقانة الحيوية، فقد تمت أمثلة معظم السلالات إضافياً من أجل تطبيقات معينة، وذلك باستعمال جولات من التطفير (mutation) والانتقاء (selection). يتم جمع الكائنات المجهرية وحفظها في تشكيلات الزرعات (culture collections). وهي تُكاثَر على أوساط غذائية صلبة أو سائلة تحت ظروف عقيمة. إن معظم الكائنات المجهرية المستعملة في التقانة الحيوية تنمو هوائياً (aerobically) على أوساط عضوية (نمو غيري التغذية (heterotrophic)). وبالنسبة إلى كائنات التمثيل الضوئي المجهرية (photosynthetic microorganisms) فتُزرع بوجود الضوء، واللاهوائيات في غياب الأكسيجين.

الزرعات النقية (Pure cultures): ويتم الحصول عليها من تشكيلات الزرعات (culture collections) أو من مواطنها الطبيعية (تراب، ماء، طعام، كائنات حية أخرى) باستعمال الزرعات المغناة. إن الطريقة المفضلة للحصول على زرعة نقية هي طريقة الأطباق المخطوطة (streak plate method)، التي يتم فيها نشر زرعة خليطة على مدى سطح الآغار (عديد سكاريد متشابك يعزل من الطحالب البحرية) المغذي المعقم، وذلك بواسطة حلقة التلقيح المعقمة (طلي (plating)). وبالنسبة إلى ظروف النمو، يتم اختيار تلك التي تؤيد نمو الكائن المجهري المرغوب عزله (الانتقاء): على سبيل المثال، يؤدي تحقيق الشروط التالية من العمل بغياب الأكسيجين، وتحت الضوء، مع التزويد بـ CO_2 كمصدر وحيد للكربون، والـ N_2 كمصدر وحيد للنتروجين، إلى إغناء الـ cyanobacteria. وكذلك تأمين وسط تغذية سكري مع رقم هيدروجيني (pH) قليل الحامضية، إلى الإغناء بالفطريات؛ والتحضين على حرارة عالية، إلى تأييد نمو الكائنات المجهرية المتحملة للحرارة العالية؛ واستخدام الكازئين (casein) كمصدر وحيد للنتروجين، إلى إعطاء الكائنات المجهرية المفرزة لأنزيم البروتياز (protease) الأفضلية لانتقائها. إضافة إلى ذَلك، بالاعتماد على تحاليل 16S-rRNA يعتقد أن أقل من 5٪ من جميع الكائنات المجهرية الموجودة طبيعياً أمكن عزلها بهذه الطرق.

تشكيلات الزرعات (Culture collections): يتم استعمالها لحفظ الزرعات النقية. ولدى إعادة تفعيلها فإن كلاً من هويتها، وحيويتها، ووظائفها الأيضية (metabolic function) يجب اختباره. إن الطريقة التقليدية للحفظ تعتمد على نقل زرعة نقية على فترات زمن منتظمة إلى أطباق الآغار (agar) أو الزرعات المائلة (slant). إلا أن هذه الطريقة يمكن أن تقود إلى تدهور نمو الكائنات الحية. لذا، يتم حفظ الأنواع الهامة أو سلالات الإنتاج تحت أحد الظروف التالية: 1) في سوائل خاملة أيضياً (metabolically inert liquids) كالزيت المعدني (مناسب للفطريات المشكلة للغصينات (hyphae))؛ 2) بالتجميد على 196ºC- في النيتروجين السائل أوعلى 70ºC- في عمق الثلاجة؛ حيث يجب أن تتم عملية التجميد والإذابة بسرعة وبوجود الغليسرول (glycerol) لمنع تحطم الخلايا ببلورات الجليد (تستعمل هذه الطريقة بشكل أساسي مع البكتيريا والخمائر)؛ 3) بتجفيف المعلق الخلوي تحت التفريغ على حامل (الرمل أو هلام السيليكا (silica gel)) وبوجود مستحلب (emulsion) معتدل (الحليب المقشود، مصل الدم) مع الحفظ على 70ºC-. وفي جميع الحالات يجب التأكد من أن السلالة المحفوظة قابلة لإعادة التفعيل. تُنشئ معظم البلدان مجمعات مزارع خلايا عامة ضخمة، بحيث يمكن طلب الزرعات النقية منها. وهي تكون شاملة لجميع أنواع الكائنات المجهرية (مثل مجمع مزارع الأنواع الأمريكية (The American Type Culture Collection (ATCC))، أو المنفَذ العام للموارد والمعلومات البيولوجية (Common Access to Biological Resources and Information (CABRI))، وهي مجموعة أوروبية تشمل مجامع الموارد العامة، مثل *Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen*، DSMZ، الألمانية، ومجامع متخصصة بمجموعات خاصة من الكائنات المجهرية، مثل *Centralburau voor Schimmelkulturen CBS* الهولندية). كما أن تمتلك جميع الشركات الصناعية التي تنتج منتجات تقانية حيوية، وكذلك العديد من المستشفيات مجامع مزارع خاصة بها.

الأمان (Safety): إن أي دراسة يستعمل فيها كائنات مجهرية يجب أن تخضع لقواعد الأمان الحيوية، لأن الممرضات (pathogens) الخطرة يمكن أن تتواجد في جميع العزلات الميكروبية (مثلاً، *Bacillus subtilis*: هي منتجة للأنزيمات التقنية غير مؤذية، *Bacillus anthracis*: هي مسببة للجمرة الخبيثة؛ *Aspergillus oryzae*: تُستعمل لإنتاج صلصة الصويا، *Aspergillus flavus*: تشكل سمّاً كبدياً خطير والمادة المسرطنة أفلاتوكسين (aflatoxin)). لذا، وتبعاً لاعتبارات الأمان تصنف الكائنات المجهرية إلى أربع مجموعات خطيرة. وبالتالي، فإن كلاً من البناء وتجهيزات المختبر، وكذلك قواعد التشغيل يجب أن تكون مكيفة مع مجموعة الخطورة ذات العلاقة. تضم مجموعة الخطورة 1 (آمنة عموماً) الكائنات المجهرية المستعملة في إنتاج الغذاء لقرون، مثل، *Saccharomyces cerevisiae* و*Aspergillus orzae*، وبذلك فإن معظم الكائنات المجهرية المستعملة في التقانة الحيوية تقع ضمن مجموعة الخطورة هذه.

مـزارع نقـيـة

1 طريقة دهن الطبق باستخدام أغار مغذي

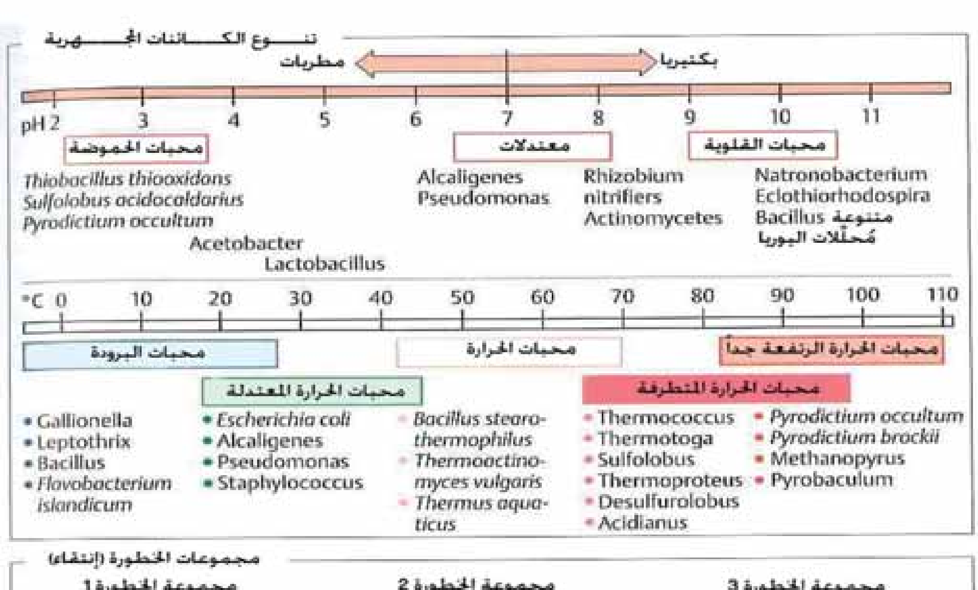
مستعمرة منفردة

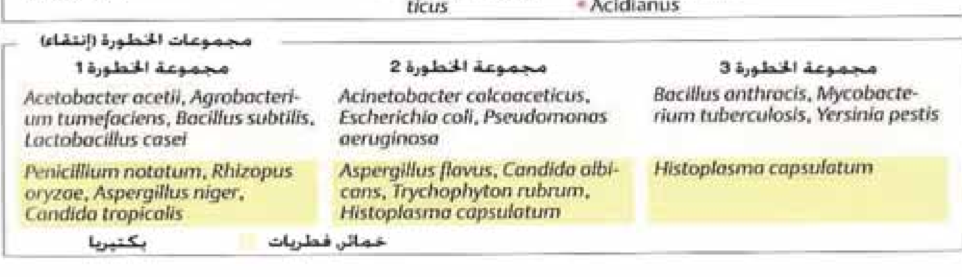
نقل المستعمرات المنفردة إلى مزرعة سائلة أو أغار مغذ: مزرعة نقية

2

زرعات إغناء (أمثلة)

البكتيريا	•	مصدر الطاقة، مغذيات
تغذية ضوئية (phototrophic) Rodospirilla Cynanobacteria	•	ضوء، H_2 أو حمض عضوي CO_2
الجمادية التغذية الكيميائية (chemolithtropic) Nitrosomonas	•	NH_4 واهب H، O_2 مستقبل H
Thiobacillus	•	H_2S، S أو $S_2O_3^{2-}$ واهبة H
مشكّلات الميثان	•	H_2 واهب H ، CO_2 مستقبل H
غيرية التغذية (heterotrophic) Pseudomonads	•	%2 KNO_3 مستقبل H، أحماض عضوية
Clostridia	•	نشاء، NH_4^+، منقوع ميستر
Enterobacteria	•	غلوكوز، NH_4
Lactic acid bacteria	•	غلوكوز، مستخلص خميرة، pH 5
Bacilli	•	نشاء، NH_4
Streptomycetes	•	مانيتول، NH_4^+
مفرزة للأنزيمات (enzyme secretors) سلالات تشكل البروتياز	•	غلوكوز، NH_4، كازئين
سلالات تشكل الليباز	•	غلوكوز، NH_4، ثلاثي البيوتيرين (tributyrin)
• هوائي	أو	■ ظروف نمو لا هوائية





مجموعات الخطورة (إنتقاء)

مجموعة الخطورة 1	مجموعة الخطورة 2	مجموعة الخطورة 3
Acetobacter acetii, Agrobacterium tumefaciens, Bacillus subtilis, Lactobacillus casei	*Acinetobacter calcoaceticus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa*	*Bacillus anthracis, Mycobacterium tuberculosis, Yersinia pestis*
Penicillium notatum, Rhizopus oryzae, Aspergillus niger, Candida tropicalis	*Aspergillus flavus, Candida albicans, Trychophyton rubrum, Histoplasma capsulatum*	*Histoplasma capsulatum*

بكتيريا   خمائر فطريات

• الكائنات المجهرية: تحسين السلالات
(Microorganisms: strain improvement)

عموميات (General). من النادر أن تبدي الكائنات المجهرية المعزولة من عينات بيئية جميع الخصائص المرغوبة في التطبيق التقني. وعليه، فهي تؤمّل بسلسلة من خطوات التطفير (mutation) والانتقاء (selection). تضم أهداف تحسين السلالات عادةً: (1) زيادة عطاء (yield) المنتج المرغوب؛ (2) إزالة المنتجات الثانوية غير المرغوبة؛ (3) تحسين الخصائص العامة للكائن المجهري خلال التخمير (مثلاً: تخفيض زمن التخمير، عدم تشكيل صبغات (pigments) معيقة، المقاومة ضد العثيات (bacteriophages)). إن الميزة الأساسية في التعامل مع الكائنات المجهرية هي قصر زمن تضاعفها (غالباً أقل من 1 ساعة): مما يسمح بإنتاج عدد كبير من الطافرات (mutants) وغربلتها (screening) في زمن قصير. كما يجب أن تؤخذ حالات التأشيب (recombination) بالحسبان لدى استخدام الكائنات المجهرية حقيقية النواة (eukaryotes) مثل الفطريات. ومع زيادة المعرفة بالأيض الميكروبي (microbial metabolism) وتنظيمه والإشفار عنه بواسطة الجينوم، تتزايد باستمرار الطرائق الوراثية التي تحذف أو تضخم خطوات أيض محددة بطريقة مستهدفة (الهندسة الأيضية).

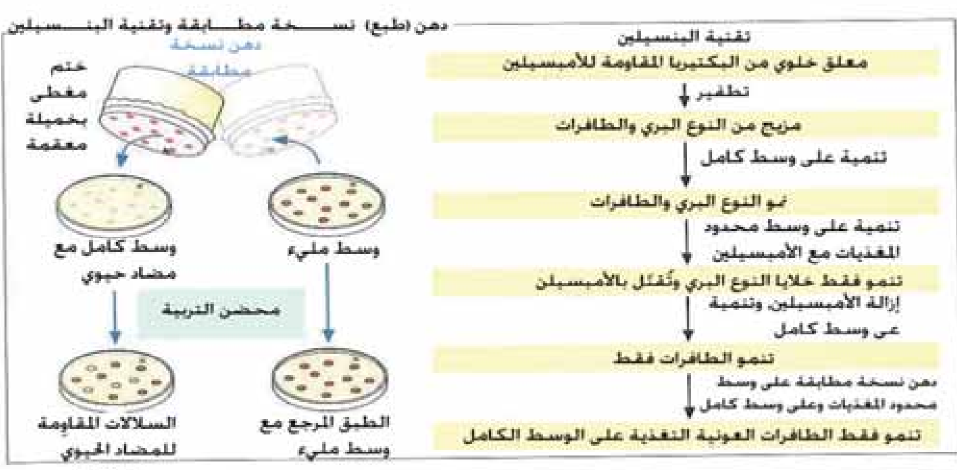
التطفير (Mulation): إن وتيرة التطفير التلقائي (تغيرات في تسلسل الـ DNA تعود إلى أحداث التطفير الطبيعي وأخطاء خلال التضاعف) هي بدرجة 10^{-7} لكل جين (100bp) ذي ثباتية عادية. حيث إن معظم الطفرات إما تبقى صامتة أو أنها ترتد وراثياً أو وظيفياً أو بآلية إصلاح DNA إلى الحالة الأصلية. لذلك، فإن تحسين السلالات الصناعية يتطلب ظروفاً أقسى للتطفير: استعمال أشعة UV أو المواد الكيميائية المطفرة، واعتماداً على الأهداف التجريبية يتم اختيار الشروط التي تؤمن معدل موت 90٪ إلى < 99٪. بعدها، يجرى انتقاء الكائنات المطفرة التي تبدي الخصائص المرغوبة من بين الكائنات التي لازالت حية، وذلك تبعاً لنمطها الظاهري (phenotype).

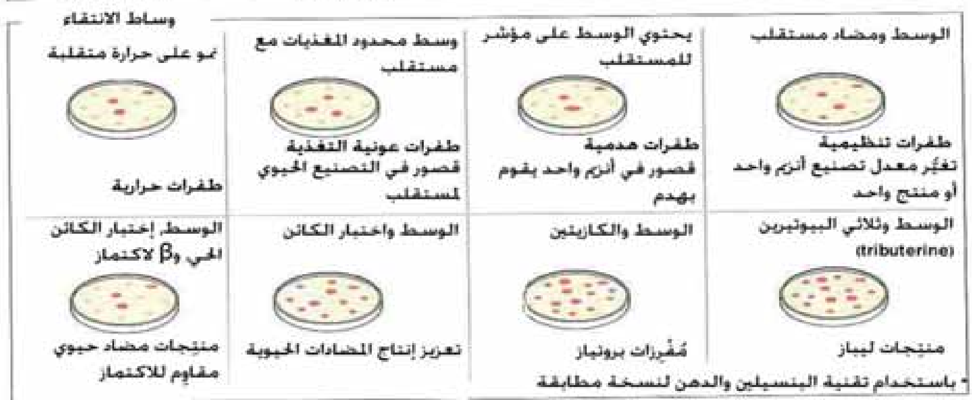
الانتقاء باستعمال الزرعات السطحية (Selection using surface cultures): يعتبر الانتقاء تبعاً للنمط الظاهري (phenotype) مرادفاً للعزل الانتقائي لطافرات عالية الإنتاجية في أغلب الأحيان. والمطلب الأساسي لتجارب كهذه هو توفر تفاعل مؤشر. على سبيل المثال، إن مقاومة الطافرة لمضادات حيوية، أو مثبطات، أو عاثيات يمكن تمييزها إذا استطاعت الطافرة النمو على آغار (agar) مغذٍ يحتوي على أحد هذه العوامل. ويمكن لتكرارية الطلي أو الدهن (replicaplanting) للكائنات المجهرية في البداية على آغار مرتفع المغذيات، متبوعة بالزراعة على وسط انتقائي، أن تعطي معلومات غاية في الأهمية. كما تساعد خطوة الإغناء على آغار يحتوي على البنسلين (penicillin) (البنسلين يمنع فقط الخلايا النامية) في تعريف الطافرات عونية التغذية ـ مخلطة التغذية ـ (auxotrophic)، التي تعتمد على وجود مستقلبات (metabolits) محددة للنمو. أما في حالة الرغبة بعزل طافرات تشكل مستقلباً فعالاً حيوياً (مثل، مضادات الحيوية أو الأنزيمات) بعطاءات أعلى، فإن حجم التثبيط أو نقيطات التحلل (lysis plaques) يمكن أن تستعمل كمؤشر. تتجلى الميزات الكبرى لإجراءات الانتقاء هذه في (1) المرونة المرتفعة في اختيار معايير الانتقاء؛ (2) العدد المرتفع للطافرات التي يمكن غربلتها بالنظر (عدة مئات على طبق آغار واحد). إلا أنه بسبب كونها طريقة تطفير عشوائية، فإن السلالات التي يتم الحصول عليها بهذا النوع من الانتقاء هي معابة في عدة جينات، ويجب اختبار نشاطها كسلالات إنتاج في تجارب منفصلة. وعند هذه النهاية، تعرض الطافرات لانتقاء أبعد بالنسبة إلى النمو، والإنتاجية، والصفات الأخرى باستعمال الدوارق الهزازة وبعدها مفاعلات حيوية صغيرة تحت ظروف شبيهة بظروف عملية الإنتاج. وكخطوة أخيرة، يمكن تصليب أفضل المرشحين من هذه الكائنات المطفرة رجعياً (back-crass) مع الأنماط البرية أو السلالات الأقل تطفيراً لخفض التأثيرات السلبية الناشئة عن المرور بالعديد من عمليات التطفير العشوائي.

الانتقاء في الزرعة المغمورة (Selection in submersed culture): لقد استعمل التخمير المستمر أيضاً لانتقاء الكائنات المجهرية. في هذ العملية، تنمّى زرعة نقية لكائن حي مجهري في الـ chemostat بوجود العامل المطفّر، كما تُعرَّض إلى ضغط تم انتقاؤه، مثلاً، باستبدال مصدر غني بالكربون تدريجياً بمصدر فقير. وخلال النمو المستمر تسود تلك الطافرات التي تأقلمت بصورة أفضل مع ظروف النمو الطارئة. إلا أن هذه الطريقة لا يمكن استعمالها لانتقاء طافرات تشكل المستقلب (metabolite) المرغوب بتركيزات أعلى.

تحسين سلالات الكائنات المجهرية

المطفّر	الآلية	التطبيق
العوامل الفيزيائية		
الأشعة المؤينة (أشعة X)	تؤدي إلى تكسر جديلة الـDNA المفردة والمزدوجة	تغييرات وراثية رئيسية
ضوء .U.V (254nm)	تشكيل جزيء ثنائي من الثايميدين والسايتيدين	طفرة نقطية
العوامل الكيميائية		
النتريت	نزع الأمونيا من الأدينين إلى الايبوكزانثين (hypoxanthine)، والسايتيدين(cytidne) إلى يوريدين (uridine)	طفرة نقطية
عوامل الألكلة	تضيف مجموعة الألكيل إلى البيورينات (purnes)	طفرة نقطية
مشابهات القواعد	تتحد بالـDNA المضاعف	تعديلات وراثية رئيسية
الأكريدين (acridine) البرتقالي	يقحم الـ DNA	تعديلات وراثية رئيسية
العوامل البيولوجية		
الترانسبوزونات (transposons)	تنقل عناصر DNA ضمن الصبغي	واسمات جينية





■ مبادئ الهندسة الحيوية

• تنمية الكائنات المجهرية (Growing microorganisms)

عموميات (General). تُزرع الكائنات المجهرية إما على مغذيات صلبة (زراعة على السطح) أو في زرعة سائلة (زراعة مغمورة). في التجارب المخبرية، يسود استخدام أطباق الآغار أو دوارق الهز. أما في الصناعة، فإن المفاعلات الحيوية هي أوعية الزرع المفضلة. إن لتركيب وسط الزرع أهمية مفتاحية في تشكيل المنتج. في معظم الحالات يتم تجنب حدوث تلوث بكائنات مجهرية غير مرغوبة بتطبيق شروط زرع عقيمة.

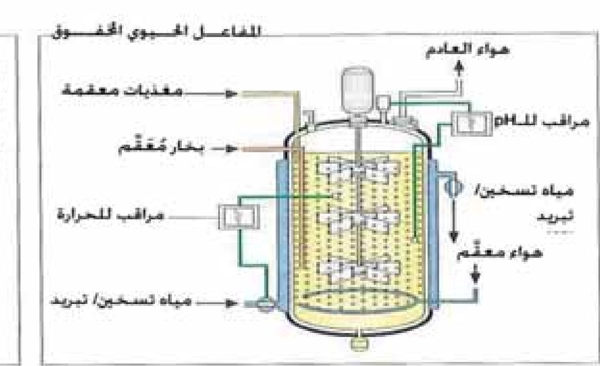
الدوارق الهزازة (Shake flasks). إن الأوعية القياسية للزراعة هي دوارق إيرلنماير (Erlenmeyer) ذات النتوء الجانبي (تملأ بحوالى 50-500ml سائل) التي تحتوي على محلول مغذٍ معقم. يتم تأمين الإشباع بالأكسيجين بهز هذه الدوارق بواسطة هزاز مضبوط درجة الحرارة يهز بحركة تبادلية (reciprocal) أو دورانية (gyrating). أما عند تنمية بكتيريا لاهوائية، فيزال الأكسيجين من وسط التغذية بالغليان ونزع الغاز (degassing)، ثم بإضافة الثايوغايكولات (thiogycolate). بعدها تنفذ الأعمال الإضافية في حجيرة ـ حيز عمل ـ (hood) عقيمة خالية من الأكسيجين.

المفاعلات الحيوية (Bioreactors). (المخمرات) هي مفاعلات مغلقة بسعة 1L حتى أكثر من $500m^3$. قياسياً، يتم تحريك المفاعل الحيوي ونقل الكتلة وتوزيع الهواء بواسطة خافقة. كما يمكن تشغيلها بطريقة مزارع الدفعة (batch cultures)، أو مزارع الدفعة مع إضافة لاحقة للمركبات الأولية (substrates) (مزرعة الدفعة المغذاة (fed-batch culture))، أو الزرعات المستمرة (continuous cultures). في الإنتاج الصناعي، تفضل مزارع الدفعة ومزارع الدفعة المغذاة؛ بينما في مرحلة الدراسات الأساسية، فإن الزرعات المستمرة ذات أهمية كبيرة لأنها تسمح للخلايا بأن تبقى بمعدل نمو نوعي (خاص) وثابت لأيام عديدة أو حتى لأسابيع. يبدأ تشكل المنتج في العديد من حالات التخمير الميكروبي، في نهاية طور النمو المطرد ـ اللوغاريثمي ـ للمزرعة. وإذا تم عند هذه النقطة إضافة المزيد من المواد المغذية بطريقة الدفعة المغذاة، أمكن إطالة طور الإنتاج لعملية التخمير وزيادة العطاء من المنتج النهائي. كما ويعتبر تجنب التثبيط بالمواد المغذية سبباً إضافياً لاتباع طريقة التخمير بالدفعة المغذاة: إذ غالباً ما تنتج الكائنات المجهرية كمية أقل من المنتَج بوجود تراكيز عالية من الغلوكوز (glucose) (الكبح بالهادم (Catabolite repression)).

تحسين الوسط (Medium optimization). إن غالبية الكائنات المجهرية المستخدمة في التقانة الحيوية هي غيرية التغذية (heterotrophic) وهوائية، تتطلب وجود مركبات عضوية كمصدر للكربون والطاقة، إضافة إلى نيتروجين غير عضوي أو عضوي، وأملاح، وآثار من بعض العناصر. تتم أمثلة الوسط المغذي عادة في دوارق الهز مع استخدام عطاء الإنتاج، وكلفة المركب الأولي (substrate)، وتوفر هذه الأوساط كمعايير أساسية (parametrers) (يمكن أن تزيد كلفة المصدر الكربوني في بعض عمليات التخمير، مثل إنتاج الإيثانول وحمض الليمون (cetric acid) على 50٪ من تكاليف الإنتاج). ولأسباب تتعلق بالكلفة، تضم غالبية الأوساط المغذية المستخدمة صناعياً مكونات غير معرَّفة بشكل جيد، كنواتج تحلل (hydrolysates) نشاء الذرة، أو المولاس (molasses) أو دقيق الصويا (أوساط معقدة)، بينما تفضل في مختبرات الأبحاث مكونات أوساط معرّفة مثل الغلوكوز ومزائج من أحماض أمينية.

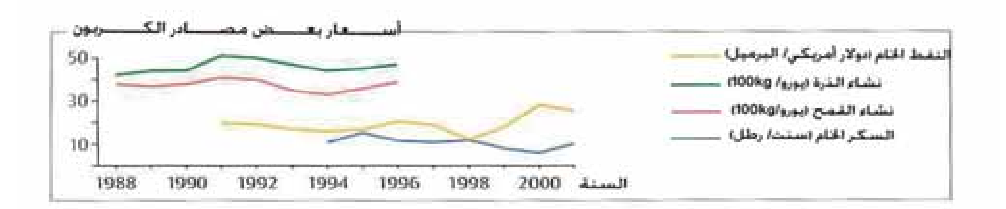
التعقيم (Sterilization). تعتبر المعاقم ـ أجهزة الأوتوكلاف ـ (autoclaves) الأفضل من أجل تعقيم الأوساط المغذية في المختبر قبل التلقيح (inoculation). يكفي التعقيم بالأوتوكلاف لمدة 15 دقيقة على 121ºC لقتل جميع الجراثيم حتى أبواغ الكائنات المجهرية المحبة للحرارة (thermophilic) (كائن الاختبار: *Bacillus stearothermophilus*). وتُعقم عادة المكونات الحساسة للحرارة مثل الغلوكوز والفيتامينات بالترشيح المعقِّم، ثم تضاف إلى الوسط المعقم بالأوتوكلاف بعد بروده. إذا جاوز حجم المفاعل الحيوي 10L تقريباً، فيتم تعقيمه عادة في مكانه بالبخار على ضغط 1.4-3bar. إلا أن هذه الطريقة تستغرق وقتاً طويلاً (عدة ساعات لدورات التسخين والتبريد)، كما يمكن أن تؤدي إلى تغيرات في تركيب الوسط بسبب طول فترة التعرض للحرارة. لذا تفضل في الصناعة طريقة التعقيم المستمر، حيث يعرض المرق المغذي للبخار على حرارة 140ºC لمدة 2 ـ 3 دقائق تقريباً (زمن الانتظار (holding time)). وباستخدام مبادلات حرارة بعكس التيار (countercurrent heat exchanger)، يُمنع تكاثف البخار كما يتم استرجاع 90٪ من الطاقة المدخلة. إضافةً إلى ذلك، قبل دخول الهواء إلى المفاعل الحيوي، يجب تنقيته بالمراشح: فقد يحوي $1m^3$ من الهواء إلى حد 2000 وحدة تشكيل مستعمرة (Colony-forming units (cfu))، حوالى 50٪ منها أبواغ فطور و40٪ بكتيريا سالبة الغرام (gram negative). إن مفاعلاً حيوياً بحجم عمل (Working volume) قدره $100m^3$ ويعمل بمعدل تهوئة يبلغ 1vvm (حجم هواء/ حجم سائل في الدقيقة (volume air/volume liquid.min))، يتطلب $6000m^3$ من الهواء المعقم بالساعة.





مكونات المغذيات

المكون	المصدر	التركيب/ملاحظات
مصادر كربون معقدة		
مولاس الشمندر السكري	إنتاج السكر	~ 48% ساكاروز
مولاس قصب السكر		~ 33% ساكاروز، ~ 22% سكر محول
شراب الذرة الكحولي الحاد	طحن الذرة	~ 1-3% غلوكوز، ~ 11-13% لاكتوز
مواد منحلة ناتجة من أجهزة التقطير	إنتاج الكحول	مختلف
النشاء والديكسترينات	تحليل نشاء الذرة	مختلف
رغوة السلفيد	إنتاج الورق	2-4% هكسوز وبنتوز (سكر سداسي وخماسي)
مصل اللبن	منتجات الألبان	3-5% لاكتوز
هيدروكربون	محطات البتروكيماويات	ألكانات أليفاتية > C-5
مصادر كربون محددة		
غلوكوز		يمكن أيضه (استقلابه) من قبل غالبية الكائنات الحية
مانيتول		مصدر كربون جيد للـ Streptomycetes
ميثانول		يمكن أيضه من قبل العديد من البكتيريا والخمائر
مصادر نتروجين معقدة		
دقيق الصويا، ودقيق فول سوداني، و دقيق بذر القمح، شراب الذرة الكحولي الحاد، مسحوق مصل اللبن، خلاصة الخميرة		المحتوى من البروتين الخام بين 20% و 6%، تحتوي على فيتامينات وآثار بعض العناصر
مصادر نتروجين محددة		
أملاح الأمونيا، نترات، بولة (يوريا)، أحماض أمينية		
فيتامينات والعناصر لضئيلة المقدار		
ثيامين(thiamin)، ريبوفلافين، بيريدوكسين (pyridoxine)، حمض النيكوتين، أميد النيكوتين ، حمض بانتوثينيك (pantothenic acid)، سيانوكوبالامين (cyanocobalamin)، حمض الفوليك، بيوتين، حمض ألفا ليبويك (α-lipoic acid)، بورين، بيريميدين، هيم(heme) معادن بتراكيز كبيرة (نسبياً) (تركيز 10^{-4} mole -10^{-3}): أملاح K, Ca, Mg, Fe, S, P معادن بتراكيز زهيدة (نسبياً) (10^{-8} mole -10^{-6}): أملاح Mn, Mo, Zn, Cu, Co, Ni, V, B, C, Na, Si		



• حركيات النمو وعمليات تشكل المنتج
(Growth kinetics and product formation)

عموميات (General). إن القواعد التي تحكم نمو الكائنات المجهرية هي معرَّفة بشكل جيد بالنسبة إلى الكائنات من الخلايا المنفردة (single-cell organisms)، ولكنها ليست كذلك بالنسبة إلى الكائنات الحية ذات الخيوط المتشابكة ـ الميسيلية ـ (myceliar) (مثل الـ streptomyces، الفطور). كما يمكن تمييز عدة أنواع من عمليات التخمير، وذلك تبعاً لحركيات (kinetics) تشكيل المنتج.

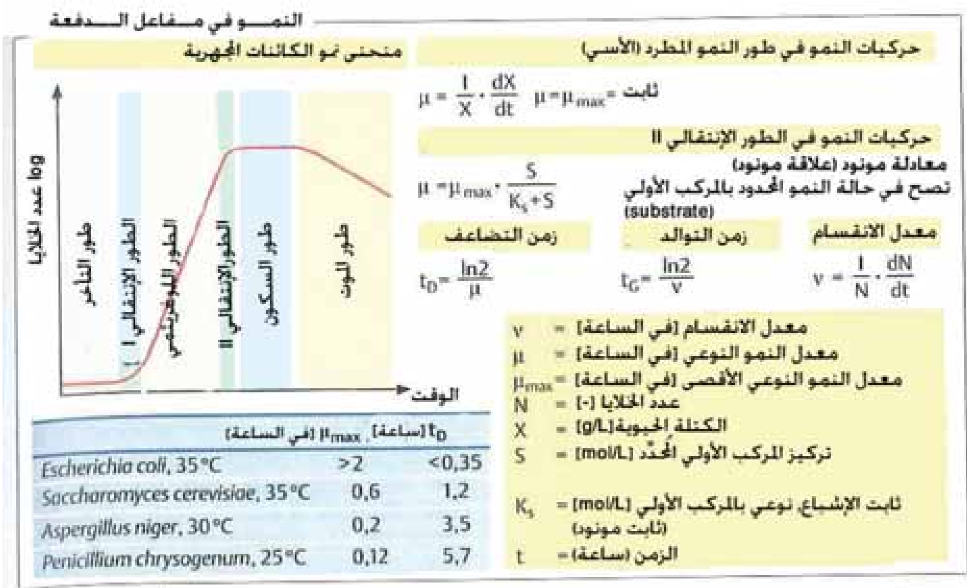
حركيات نمو الكائنات المجهرية وحيدة الخلية (Growth kinetics of unicellular organisms). إن معظم الكائنات المجهرية والخمائر هي وحيدة الخلية (unicellular)، تتكاثر بالانقسام الخلوي، ويمكن رصد تزايد عددها باستمرار من خلال طرائق بصرية، مثل، قياس العكر (turbidity). في الزرعة الساكنة (static)، مثل، دورق الهز (shake flask) الصغير أو مفاعل الدفعة (batach reactor)، يلي الطورَ المتأخرَ ـ طور الراحة ـ (lag phase) (حيث يتم تحريض تشكل أنزيمات هامة للتصنيع الحيوي)، بعد طور انتقالي (transition phase) قصير، طورُ النمو المطرد ـ اللوغاريتمي ـ (log phase) ذي حركيات من الدرجة الأولى (first order kinetics). ويتم الوصول إلى الطور الانتقالي (transition) التالي (الطور II) متى أصبح أحد المركبات الأولية (substrates) محدود الكمية أو أحد المنتجات مثبِّطاً (inhibiting)، ثم يلي هذا الطورَ طورُ السكون، حيث تؤدي محدودية المركبات الأولية، أو كثافة الخلايا الزائدة، أو نقل الأكسيجين المحدود أو تراكم المنتجات من المستقلبات (metabolites) السامة إلى إنهاء النمو، لِيَلِي ذلك طورُ الموت (death phase)، الذي يتصف بتناقص عدد الخلايا. ولتوصيف منحنى النمو، يجب رصد المعايير الهامة التالية: 1) الطور المتأخر (وحدة قياسه: الساعة (h))، الذي يتعلق بالكائن المجهري نفسه، والشروط الوظائفية ـ الفيزيولوجية ـ لمادة التلقيح (inoculation) وتركيب المادة المغذية؛ 2) معدل النمو النوعي (specific growth rate) (وحدة قياسه: في الساعة الواحدة (h^{-1}))، الذي يسمح لمعدل تشكل الخلايا أن يكون مرتبطاً بتركيز الخلايا أثناء طور النمو المطرد ـ الأسي ـ (exponential phase). فعندما يعبّر عن ذلك بمعادلة مونود (monod):

$$\mu = \mu_{max} . S/(K_S + S)$$

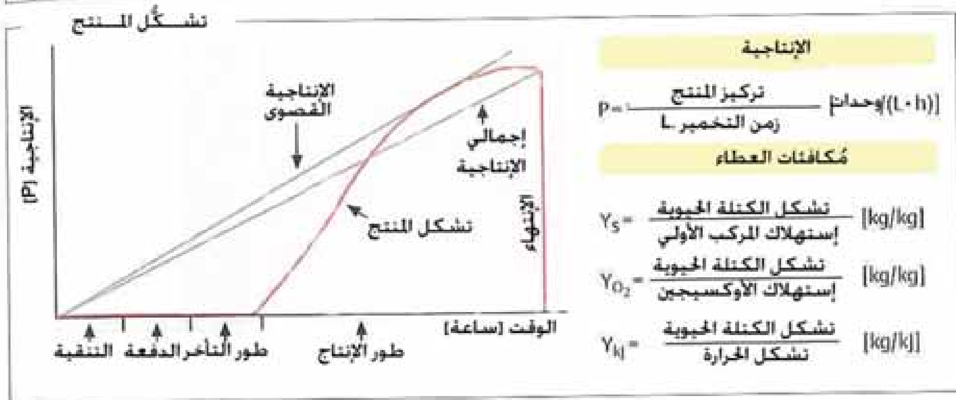
فإنه يسمح بتحديد تجريبي لسرعة نمو الخلايا؛ 3) ثابت الإشباع (saturation phase) K_S في هذه المعادلة، وهو يرجع إلى تركيز المركب الأولي (ذات وحدة قياس: mgL^{-1}) الذي وصل عنده معدل النمو إلى 50٪ من المعدل الأقصى. ومن وجهة نظر شكلية، فإن K_S تعادل K_M، أي ثابت ميكايليس (Michaelis constant)، في الحركيات الأنزيمية؛ 4) ارتباط معدلات النمو بما يعرف بالجيل (generation) أو بزمن التضاعف (doubling time)، وهو معيار يُشار إليه بوحدة القياس: الساعة (h)، أي أنه سرعة تضاعف الزرعة البكتيرية وذلك في الشروط الأسية؛ 5) مكافئ العطاء Y_S، وهو قياس لتشكل الكتلة الحيوية (biomass) لكل مركب أولي مستهلك، بحيث يمكن تعريف عدة مكافئات عطاء لأن تشكل الكتلة الحيوية يعتمد على كل من المعايير الكيميائية (ضغط الأكسيجين المنحل، نسبة الكربون إلى النيتروجين (C/N ratio) والمحتوى من الفوسفات) والفيزيائية (مثل، درجة الحرارة). أما في حالة استخدام أوساط مغذية معقدة، فإنه يمكن ملاحظة وجود طوري نمو لوغارثميين مفصولين بطور متأخر (نمو ثنائي مساعد (diauxic growth)). ويعود ذلك إلى زمن التأخر (lag time) اللازم لتحريض أنزيمات جديدة بعد نضوب مصدر الكربون الأول.

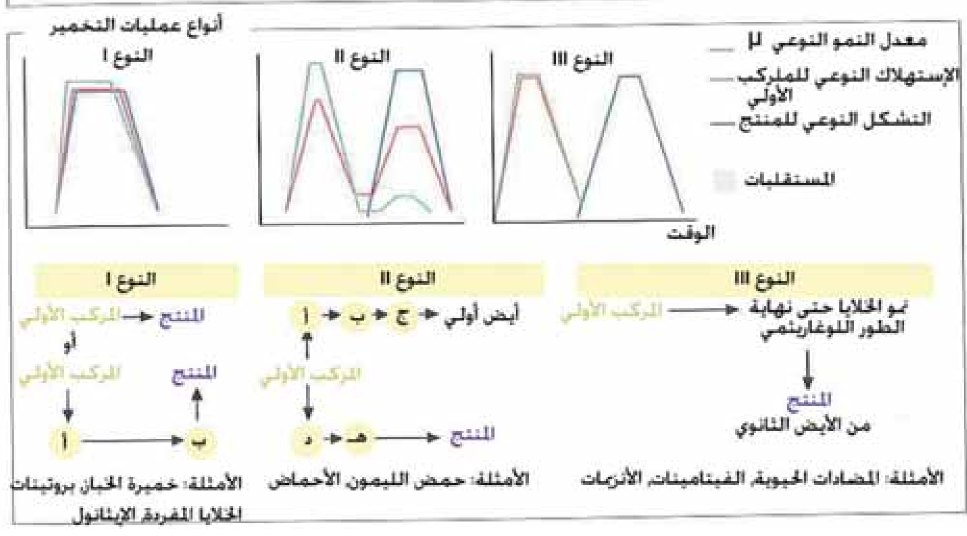
حركيات نمو الكائنات المجهرية المشكِّلة للخيوط الميكروبية المتشابكة (الميسيليوم) (Growth kinetics of myecelium-forming microorganisms). لا تنمو الفطور، وأوليات النوى المشكِّلة للميسيليوم كالـ Streptomycetes بالانقسام الخلوي فقط، وإنما أيضاً بالنمو الطولي للمايسيليوم. ويتم عادة تحديد النمو بقياس وزن الكتلة الحيوية (biomass) الجافة الأمر الذي يقود لحركيات معقدة.

تشكل المنتج (Product formation). يكون تشكل المنتج في معظم عمليات التخمير إما مقترناً بالنمو أو غير مقترن به، مع وجود قلة قليلة جداً من العمليات التي لا تنتمي إلى أحد هذين النوعين الأساسيين. في التصنيف التقليدي، يسمى تشكل المنتج المقترن بالنمو بالنوع الأول (type I) من التخمير؛ وهو يتضمن تشكل كتلة خلوية (خميرة الخباز، وبروتين الخلية المنفردة ((single cel protein (SCP))، والطحالب (algae)) والتخمير الكحولي. ويسمى تشكل المنتج غير المقترن بالنمو بالنوع الثالث (type III) من التخمير؛ الذي يحدث في نهاية طور النمو المطرد ـ اللوغاريتمي ـ (logarithmic phase)، بحيث لا ينشأ المنتج من الأيض الأولي، (primary metabolism) وإنما من الأيض الثانوي. والأمثلة على ذلك: إنتاج مضادات الحيوية (antibiotics) والأنزيمات الخارج خلوية (extracellular enzymes). أما في النوع الثاني (type II)، فيتولد المنتج من سبل جانبية للأيض الأولي ويتم تصنيعه على التوازي مع نمو الكتلة الخلوية، مثل: إنتاج حمض الليمون (cetric acid) والأحماض الأمينية. إلا نه بسبب تشكل غالبية منتجات هذا النمط بالاقتران بالنمو، فإنه يقتصر حالياً تصنيف عمليات التخمير على النمطين الأول والثالث.



	μ_{max} [في الساعة]	t_D [ساعة]
Escherichia coli, 35°C	>2	<0,35
Saccharomyces cerevisiae, 35°C	0,6	1,2
Aspergillus niger, 30°C	0,2	3,5
Penicillium chrysogenum, 25°C	0,12	5,7





التخمير بالدفعة المغذاة والتخمير المستمر
(Fed-batch and continuous fermentation)

عموميات (General). في التخمير بالدفعة المغذاة، يتم إطالة طور الإنتاج بتغذية المخمر بوسط مغذ. وهو البروتوكول الإجرائي المفضل في الصناعة. بينما يعتبر التخمير المستمر أقلّ عمليّة، ولكنه ذو أهمية أساسية كبيرة لأنه يسمح بدراسة القوانين التي تحكم النمو والأيض الميكروبي (microbial metabolism).

إجراءات الدفعة المغذاة (Fed-batch procedures). وهي تمتلك ميزتين: الأولى، أنها تزيد عطاءات العديد من المسقلبات الثانوية (secondary metabolites) المنتجة صناعياً (مضادات حيوية (antibiotics)، أنزيمات، عديدات الساكاريد، . . . الخ)، وذلك بتقديم وسط طازج أو وحدات بناء وسيطة (intermediary building blocks) في نهاية طور النمو المطرد ـ اللوغاريتمي ـ (logarithmic phase) عند انقطاع الأيض الثانوي مباشرةً. والثانية، أنها يمكن أن تمنع التثبيط الناجم عن المركب الأولي (substrate)، وذلك بتحديد مستوى الغلوكوز في الوسط بعناية. يعتبر الغلوكوز مصدر الكربون والطاقة الأكثر استخداماً في التخمير، لكن وجود فائض منه، أثناء إنتاج مضادات الحيوية على سبيل المثال، يكبح تشكل المنتج من خلال المواد الهادمة (catabolite repression). كما أن إنتاج خميرة الخبز هو مثال آخر على الكبح بالمواد الهادمة: إذ تؤدي التراكيز المرتفعة من السكر إلى زيادة معدل النمو النوعي (specific growth rate)؛ ولكن، من جهة أخرى، إلى تناقص مكافئ عطاء الكتلة الحيوية Y_S (biomass yield coefficient) بقوة، وذلك بسبب تحول كميات متزايدة من الغلوكوز إلى إيثانول (ethanol) (أثر كرابتري (Crabtree effect)). لذا، تتم إضافة السكر إلى مرق التخمير بطريقة الدفعة المغذاة. وكذلك، عند دراسة مصادر النتروجين والفوسفور فقد لوحظ وجود متطلبات مشابهة.

عمليات التخمير المستمرة (Continuous fermentations). يعتبر مفاعل الدفعة (batch reactor) عادة نظاماً مغلقاً، بالرغم من وجود تبادل غازي مع البيئة المحيطة. في حين أنه خلال التخمير المستمر، لا يكون هناك تبادل للغاز مع البيئة المحيطة فقط، وإنما يكون المفاعل الحيوي بمثابة نظام مفتوح يُغذى باستمرار بمرق (broth) مغذ عقيم، ويزال منه باستمرار وسط الزرع. تُميَّز عادةً ثلاثة أنواع من أنماط التخمير المستمر: الأول منظم كيميائياً (chemostat)، حيث تثبت مستويات المواد المغذية؛ والثاني منظم بالاعتماد على مستوى العكر (turbidostat)، حيث يثبت المحتوى من كتلة الخلايا؛ والثالث هو عبارة عن مفاعل الجريان المقنن (plug-flow reactor)، بحيث يسيل وسط الزرعة عبر مفاعل أنبوبي بدون مزج ارتجاعي، في حين تسترجع الكتلة الخلوية عند مخرج المفاعل، ثم تعاد إليه من مدخله. في هذا النظام، تشبه شروط الجريان، مثل، تركيب الوسط، وتركيز الكتلة الحيوية (biomass) وتركيز المنتج، شروط مفاعل الدفعة. وتحت شروط التوازن، يُعوَّض ضياع الخلايا من الدفق الخارج بمعدل النمو النوعي (specific growth rate) للكائنات المجهرية؛ بينما يبقى ثابتاً تركيز المركب الأولي S (substrate) ومعدل تشكل المنتج (rate of product formaton) Q_x الذي يعتمد كأول تقريبٍ وحيد على معدل الجريان. إن مفاهيم عمليات التخمير المستمرة هي أكثر صعوبة من أن تُطوَّر لإنتاج مستقلبات ثانوية (النوع الثالث من عمليات التخمير)، وذلك لأن النمو الخلوي وتشكل المنتج غير مقترنين مباشرة. فالتخمير المستمر مفيد في 1) أمثلة نمو الخلايا وتشكل المنتج، و2) تحليل المكونات المغذية المُحِدَّة. لكنه نادراً ما يستخدم في عمليات التخمير على مستوى صناعي. والاستثناءات القليلة في ذلك تتمثل في المعالجة الهوائية (aerobic) واللاهوائية (anaerobic) لمياه الفضلات، والأشكال الجديدة من عمليات إنتاج البيرة، وتصنيع الإنسولين البشري باستخدام سلالات من الخمائر المأشوبة (recombinant). إلا أنه من الثابت في غالبية عمليات التخمير الصناعي، أن 1) العمليات المستمرة تُظهر فائدة اقتصادية، مقارنة بالتخمير بالدفعة المغذاة وذلك بعد 500 ـ 1000 ساعة فقط من التشغيل المستمر ـ وهو شرط غاية في الصعوبة تحقيقه، من حيث إدارة التشغيل العقيم ومضادات العدوى؛ 2) من الصعب الحفاظ على تركيب ثابت للأوساط المغذية خلال هذه الفترة الطويلة من الزمن؛ و3) عدم إمكانية تأمين الثباتية الوراثية للكائنات الحية المأشوبة المستخدمة كمضيف بعد الانقسامات الخلوية لأجيال عديدة.

أنواع المفاعلات

مفاعل الجريان المقنن
المنتج
إعادة تدوير الخلايا
وسط التغذية (تغذية مستمرة)

المنظّم اعتماداً على مستوى العكر
المنتج
قياس العكر
وسط التغذية (كتلة خلوية مستمرة)

المنظّم كيميائياً (الكيموستات)
المنتج
وسط التغذية (تغذية مستمرة)

معدل التخفيف والعطاء

X $[g \cdot L^{-1}]$
S $[g \cdot L^{-1}]$
t_D [h]
DX $[g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}]$
S_0
X
DX
S
v
0,25 0,50 0,75 1,00
معدل التخفيف [في الساعة]
h: ساعة

S = تركيز المركب الأولي [g/L]
X = الكتلة الحيوية [g/L]
t_D = زمن التضاعف [ساعة]
DX = الإزالة الخلوية [g/L في الساعة]

توازنات الكتلة الخلوية والمركب الأولي

Y_S = مُكافئ العطاء [kg/kg]
K_S = ثابت مونود [g/L]
S_0 = تركيز المركب الأولي في التغذية [g/L]
S = تركيز المركب الأولي في المفاعل الحيوي [g/L]
D = معدل التخفيف [في الساعة]
X = الكتلة الحيوية [g/L]
μ = معدل النمو المحدد [في الساعة]
μ_{max} = معدل النمو المحدد الأقصى [في الساعة]

الكتلة الحيوية

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - D \cdot X \quad (1)$$

المركب الأولي

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{\mu \cdot X}{Y_S} \quad (2)$$

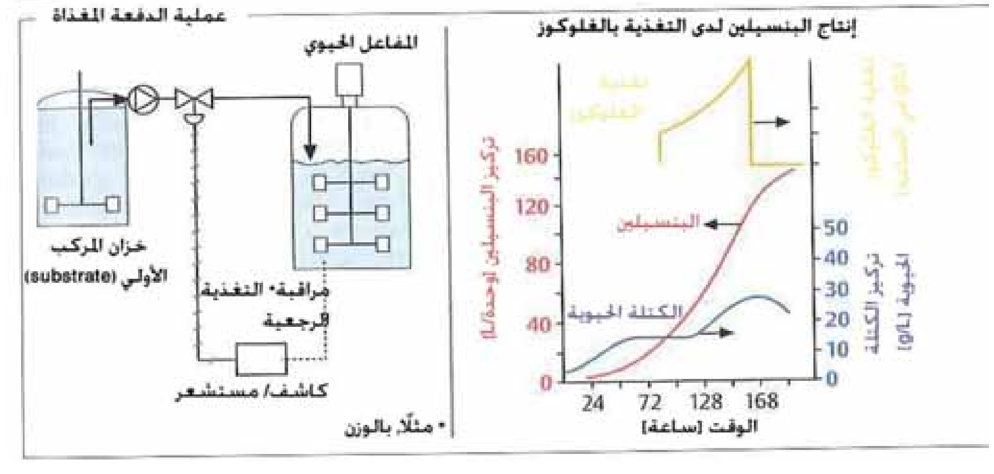
في حالة السكون تتبع:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{dS}{dt} = 0 \quad (3)$$

كما تتبع أيضاً $\mu = D$

باستخدام (3) مع (1) و(2):

$$X = Y_S (S_0 - S) \qquad D = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \qquad S = \frac{D \cdot K_S}{\mu_{max} - D}$$



• تقانة التخمير (Fermentation technology)

عموميات (General). لتصنيع منتجات تقانية حيوية بكلف مقبولة، فإن لهندسة العمليات الحيوية، وهو اختصاص وضعه المهندسون، أهمية مماثلة لأهمية العلوم الحيوية المطورة من قبل البيولوجيين والكيميائيين الحيويين. تتمثل الأهداف المفتاحية لهندسة العمليات الصناعية في أمان تشغيل العمليات، وانقاص كلف الاستثمار والتشغيل إلى الحد الأدنى. أما المظاهر الهامة لهذه المهام، فهي: 1) نقل الكتلة المؤمثل؛ 2) المحاليل التقانية للحفاظ على درجة حرارة ثابتة؛ و3) أمثلة التهوئة (بالنسبة إلى العمليات الهوائية).

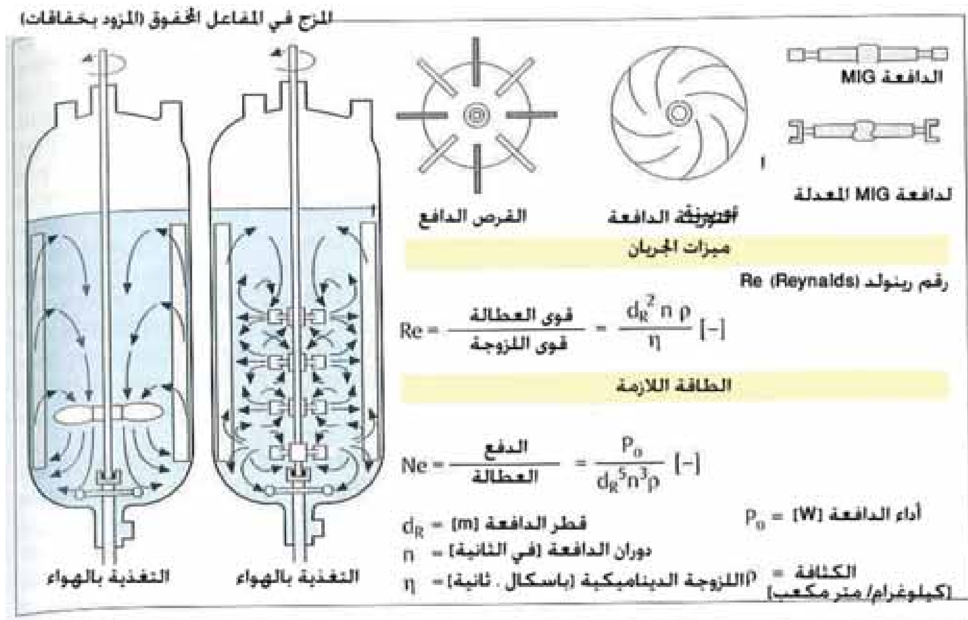
المزج (Mixing). يتم المزج في المفاعل الحيوي بواسطة خفاقات أو مضخات، ما يؤدي إلى توليد تيار مضطرب في الجوار المتاخم للخفاقة، الذي يتميز برقم رينولدز Re، (Reynolds) خاص. كما تساهم في المزج أيضاً التهوئة في العمليات الهوائية. أما اللزوجة فتعتبر من العوامل التي تتدخل في حساب الرقم رينولدز، وهي تعتمد على تركيز الكائنات المجهرية، وشكلها الفيزيائي (مثل، الخيوط الفطرية المتشابكة ـ الميسيليوم ـ (mycelium) في التخمير الفطري)، ونوع المنتج (مثل، الكزانثان (xanthan)). وفي مفاعل حيوي ممزوج بشكل مثالي، يتوزع الاضطراب الناتج من المزج في منطقة التفاعل بشكل متجانس. إلا أن هذا الهدف هو فقط تقريبي بسبب حساسية المواد البيولوجية. على سبيل المثال، محدودية سرعة الخفق بحساسية المايسيليوم للجز (shear). بالإضافة إلى تدخل عدة عوامل مثل هندسة الخفاقات، وشكلها وعددها، وموقع الوحدات الميكانيكية كالعوارض الجانبية، وموقع المضخات (في المفاعلات التي لا تحوي خفاقات)، وشكل وموقع صفائح التهوئة ومضخات الهواء (في المفاعلات المزودة وغير المزودة بخفاقات). ويعبّر رقم القوة Ne، (power number) عن الطاقة المطلوبة من قبل المفاعلات المزودة بخفاقات، وهو مرتبط برقم رينولدز في الحالة المزال فيها الغاز (degassed state). لقد تم تطوير خفاقات مختلفة للاستخدام الصناعي، مثل، القرص، التُربين ـ العنفة ـ (turbine)، الدافع الدوار[15] والدافع الدوار MIG المعدل (InterMIG)، التي تدعم كلاً من المزج ونقل الأكسيجين بشكل جيد، وهما معياران يتم قياسهما وفق مكافئ النقل الحجمي K_La.

ضبط الحرارة (Temperature control). لنتائج أمثل، تُنفذ عمليات التخمير عند درجة حرارة ثابتة. فبعد تسخين أوّلي، وفق ما هو مطلوب لنمو الخلايا، تبرد عادة مفاعلات التخمير كون كلاً من النمو الميكروبي والخفاقة ينتجان الحرارة، التي يجب إزالتها. ولحساب الحرارة المنتجة في العملية، يجب الأخذ بعين الاعتبار رقم نقل الحرارة ومساحة سطح التبادل في المخمر. يكفي عادة إزالة الحرارة بنظام التبريد المائي الذي يحيط بالمفاعل الحيوي، لكنه عندما تكون مكافئات العطاء (yields coefficients) عالية جداً (قيم Y_{KJ} منخفضة)، كما في تخمير الألكان (alkane) بالخمائر على سبيل المثال، فإنه يجب استخدام مبادلات حرارة داخلية إضافية.

التهوئة (Aeration). يُحَدّ نمو الزرعات الهوائية بمحتوى سائل الزرع من الأكسيجين. ولتحسين محتوى الأكسيجين، يجب أخذ عدة عوامل بعين الاعتبار. على سبيل المثال، يرتبط النقل الأمثل للأكسيجين في المفاعل الحيوي (bioreactor) بمعدل الأخذ الأقصى النوعي للأكسيجين (Specific maximum oxygen uptake rate) $q_{O_2}^{max}$ من قبل الكائن المجهري. إضافة إلى ذلك، يتم نقل الأكسيجين بواسطة نظام ثلاثي الطور يتضمن الطور الغازي والطور السائل والكائن المجهري، بحيث يجب تجاوز عدة أطوار متاخمة ليتم نقل الأكسيجين: 1) من فقاعة الغاز إلى سطح الطور المتاخم؛ 2) عبر سطح الطور المتاخم إلى السائل؛ 3) عبر السائل إلى الكائن المجهري المحيط المتاخم؛ و4) إلى داخل الخلية. يكون غالباً سطح الطور المتاخم 2 عند الكائنات الحية الخلوية المنفردة (single-cell microorganisms) عاملاً مُحِدّاً، بينما يكون غالباً الطور 4 هو العامل المُحِدّ في حالة تجمع الخلايا أو تشكل الخيوط المتشابكة من الكائنات المجهرية ـ الميسيليوم ـ (mycelium). كما يتعلق نقل الأكسيجين أيضاً بمجموعة واسعة من الشروط التقانية مثل أبعاد المفاعل، الضغط الهيدروستاتي ـ ضغط توازن الموائع (hydrostatic pressure) (ارتفاع الملء)، أداء الخفاقة، نظام ومعدل التهوئة، معايير كيميائية وفيزيائية كيميائية مثل نوع المواد المغذية، كثافة ولزوجة الوسط، درجة الحرارة، ضغط السطح (مضادات الرغوة)، وعوامل بيولوجية مثل شكل نمو الكائن المجهري. كما يعد مكافئ النقل الحجمي K_La، الذي يمكن تحديده تجريبياً، معياراً هاماً لتوصيف نقل الأكسيجين في المفاعل الحيوي.

---

(15) نوع من المازجات الدوارة الملائمة للأوساط قليلة ومتوسطة اللزوجة مصنعة وملحمة بمواد خاملة (MIG: Metal inert gas).



ميزات الجريان

رقم رينولد Re (Reynalds)

$$Re = \frac{\text{قوى العطالة}}{\text{قوى اللزوجة}} = \frac{d_R^2\, n\, \rho}{\eta}\ [-]$$

الطاقة اللازمة

$$Ne = \frac{\text{الدفع}}{\text{العطالة}} = \frac{P_0}{d_R^5 n^3 \rho}\ [-]$$

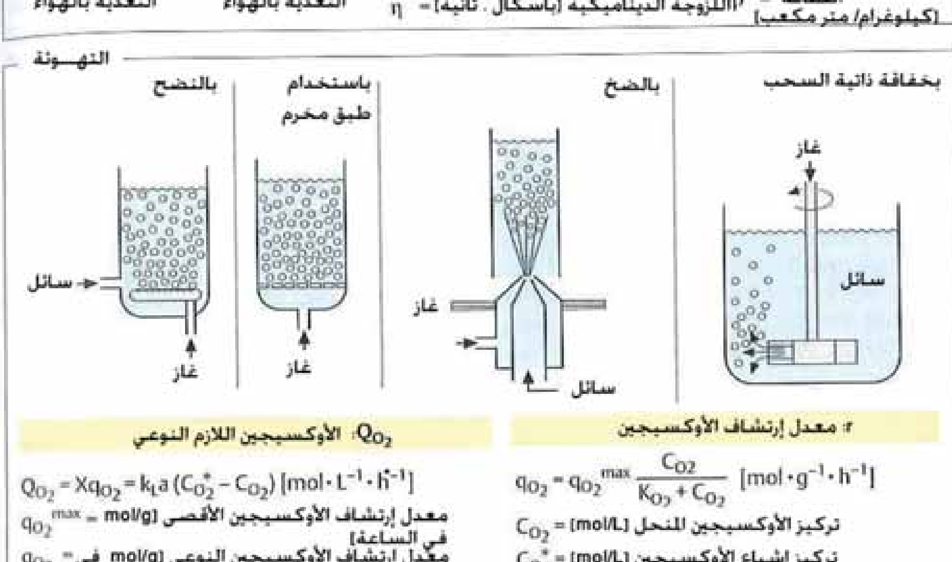
d_R = [m] قطر الدافعة

P_0 = [W] أداء الدافعة

n = [في الثانية] دوران الدافعة

η = [باسكال . ثانية] اللزوجة الديناميكية

ρ = الكثافة [كيلوغرام/ متر مكعب]



معدل إرتشاف الأوكسيجين*

$$q_{O_2} = q_{O_2}^{max} \frac{C_{O_2}}{K_{O_2} + C_{O_2}}\ [mol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}]$$

C_{O_2} = [mol/L] تركيز الأوكسيجين المنحل

$C_{O_2}^*$ = [mol/L] تركيز إشباع الأوكسيجين

K_{O_2} = [mol/L] ثابت ميكايلس (Michaelis) للأوكسيجين

Q_{O_2}: الأوكسيجين اللازم النوعي

$$Q_{O_2} = Xq_{O_2} = k_La\,(C_{O_2}^* - C_{O_2})\ [mol \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}]$$

$q_{O_2}^{max}$ = mol/g معدل إرتشاف الأوكسيجين الأقصى [في الساعة]

q_{O_2} = mol/g معدل إرتشاف الأوكسيجين النوعي [في الساعة]

k_La = [في الساعة] مُكافئ الانتقال الحجمي

X = [g/L] تركيز الكتلة الحيوية

* h: ساعة

B: معدل التهوئة

$$B = \frac{\text{حجم الهواء}}{\text{حجم المفاعل}}\ \text{دقيقة (vvm*)}$$

* vvm: حجم هواء لحجم المفاعل في الدقيقة

$$N_B = \frac{V_G}{n d_R^3}\ [-]$$

V_G = [متر مكعب في الثانية] تيار حجم الهواء

n = [في الثانية] دوران الدافعة

d_R = [m] قطر الدافعة

قيمة k_L: إنتقال الأوكسيجين

$$k_La = k\left(\frac{P}{V_R}\right)^{\alpha} (u_G^0)^{\beta}\ [h^{-1}]$$

k, α, β = [-] ثوابت

P = [W] أداء الدافعة

V_R = [متر مكعب] حجم المفاعل

u_G^0 = [متر بالثانية] سرعة الغاز السطحية

• تقانة التخمير: رفع مستوى الإنتاج

(Fermentation technology: scale-up)

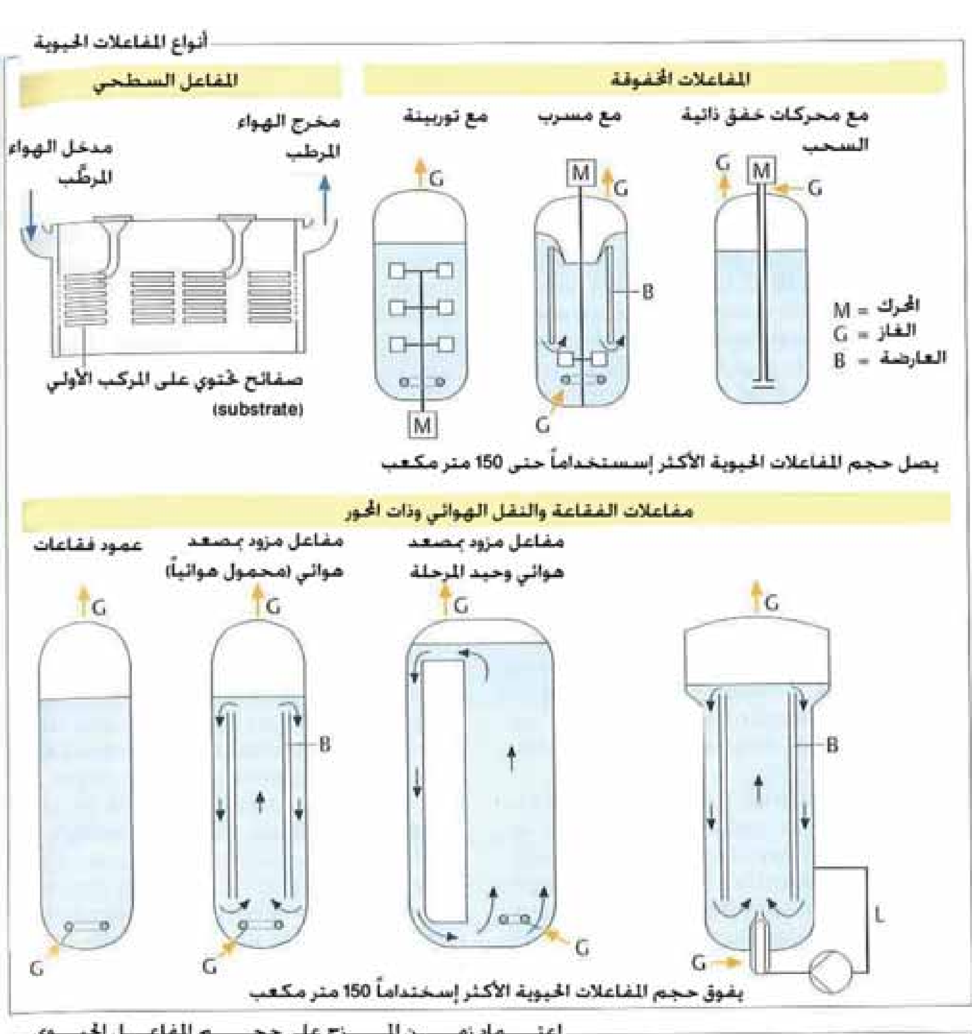
عموميات (General). يجب أثناء نقل العمليات من مستوى التطوير إلى مستوى الإنتاج (رفع مستوى الإنتاج)، الأخذ بعين الاعتبار تغير عدة معايير. وتبعاً للعملية ولحجم الإنتاج المرغوب، يمكن استخدام عدة أنواع من المفاعلات الحيوية (bioreactors)، في حين يبقى المفاعل المخفوق النوع الأكثر شعبية. تقليدياً، يتم رفع مستوى الإنتاج على خطوات عشرية (30L إلى 300L إلى 3000L إلى المستوى الإنتاجي).

رفع مستوى الإنتاج (Scale-up). حتى في المستوى التجريبي (pilot scale)، تكون المفاعلات الحيوية مجهزة بدوافع دوارة (impellers)، تُربينات، عوارض جانبية، مضخات أو وحدات تهوئة من أجل إتاحة المزج الجيد. وليتم نقل النتائج من المستوى التجريبي إلى المستوى الإنتاجي، يجب الأخذ بالحسبان أن زمن المزج يزداد بشكل كبير مع زيادة الحجم وأن هذا المزج السريع في أحجام مفاعلات تفوق الـ $150m^3$ ليس فقط صعب التحقيق بل يستلزم كلف طاقة كبيرة لدرجة غير ممكنة. هذه الحقيقة تأتي أيضاً ضد مصلحة البلازميدات (plasmids) التي تحمل محث λ، (λ promoter): فالارتفاع السريع في الحرارة اللازمة للتحريض أمر غير وارد على الإطلاق في مخمر إنتاج كبير. وبمعزل عن المزج، فإن إجهاد الجز (shear stress) الميكانيكي يقيد عملية التخمير في حالة الفطور أو سلالات الـ Streptomyces. كما أن هناك براهين مشابهة تنطبق على توزع فقاعات الهواء أثناء التهوئة والتبريد.

أنواع المفاعلات الحيوية (Bioreactors types). إن المفاعلات الحيوية السطحية المستخدمة في تصنيع حمض الليمون (cetric acid) هي في غالبيتها ذات أهمية تاريخية، رغم أن مرشح الجريان المتقطع (trickling filter) المستخدم في المعالجة الهوائية (aerobic treatment) لمياه الفضلات يعتبر مثالاً هاماً على هذا النوع من المفاعلات. إن المفاعلات السطحية سهلة التشغيل، إلا أن العطاء من المنتج بالنسبة إلى الحجم والفراغ (volume-space yield) يبقى محدوداً. أما اليوم، فإن المفاعلات الحيوية المخفوقة هي التجهيزات المفضلة. فهي مضبوطة الحرارة والرقم الهيدروجيني (pH)، ومجهزة بخفاقات ونظم تهوئة. كما أن لها صمامات لإضافة المغذيات وسحب العينات معقمة. وبالنسبة إلى الخفاقات فيها فتكون عادة متعددة الطبقات ومُكمَلة بعوارض جانبية؛ في حين ما زالت تُستخدم في بعض المفاعلات خفاقات من طبقة واحدة مع جريان عالٍ وأنابيب تسريب. بالإضافة إلى استخدام محركات هز ذاتية السحب (self-aspiring agitators) في عمليات إنتاج حمض الخل (acetic acid) وفي المعالجة الهوائية لمياه الفضلات. يتراوح حجم المفاعلات الحيوية البحثية بين 1 و300L تقريباً، كما يمكن أن تتوفر مفاعلات حيوية مخفوقة بحجم عمل (working volume) يصل حتى $500m^3$ في مجال الإنتاج الصناعي. ولدى استخدام أحجام أكبر، فإن متطلبات الطاقة لتأمين المزج السريع ونقل الحرارة تزداد بسرعة. لذا تفضل مفاعلات الدارة (loop) أو مفاعلات الحمل الهوائي (airlift) في الأحجام الكبيرة من المخمرات التي تصل حتى $1500m^3$؛ حيث تستخدم في هذه النظم مضخات هائلة أو حاقنات كأدوات مزج. في هذا الكتاب، تم ذكر تصنيع البروتين من الخلايا المنفردة (single-cell proteins) ومعالجة مياه الفضلات هوائياً كأمثلة نموذجية تم خلالها استخدام مفاعلات الحمل الهوائي صناعياً.

القياس والضبط (Measurement and control). وهي الإجراءات الأهم في التحسين الاقتصادي للعمليات الحيوية (bioprocess)، ولأمان التشغيل في المفاعل. وتضم القياس الروتيني لمعايير عدة من وزن المفاعل، ودرجة الحرارة، وقيمة الرقم الهيدروجيني (pH)، ومحتوى المرق المغذي من الأكسيجين، وعدد الدورات، والطاقة المستخدمة في الخفق. كما يتم عادة تحليل الـ CO_2 (بواسطة التصوير الطيفي بالأشعة تحت الحمراء (IR spectroscopy)) والـ O_2 (بالرنين الممغنط (Paramagnetic resonance)) في الهواء الداخل والخارج لتحديد معادل التنفس RQ (respiratory quotient) الذي يعطي معلومات مفتاحية حول النمو وشروط الزرع. وبالنسبة إلى استهلاك المركب الأولي (substrate) وتشكل المنتج خارج المفاعل الحيوي، فيُحدد بعد سحب عينة بإجراءات عقيمة. في الختام، يجري باستمرار تحديث طرائق تشغيلية وضبط للعقامة يمكن الوثوق بها، وذلك نظراً إلى القيمة العالية لمحتوى المفاعل الحيوي (حتى إذا كانت قائمة على أساس سعر السوق البالغ $10€kg^{-1}$ للمنتج، وتركيز منتج نهائي قدره $100gL^{-1}$، فإن قيمة المنتج بعد التخمير في مفاعل حيوي ذي حجم $100gL^{-1}$ تبلغ 100000€).

إزالة الرغوة. إن تشكل الرغوة أثناء تهوئة المحاليل البروتينية هو عائق شائع في عمليات التخمير. لقد تمت مواجهة ذلك بمزيل الرغوة الميكانيكي (تحطيم الرغوة حرارياً أو الطرد المركزي للرغوة) الواقع في أعلى محور الدافع الدوار. وفي حالة كون تشكل الرغوة شديداً جداً، يمكن إضافة عوامل كيميائية مضادة للرغوة مثل حمض الإيرُسيك (erucic acid) أو السيليكون (silicon). إلا أن سيئة هذه المواد تتمثل في وصولها إلى المنتج النهائي للتخمير مع صعوبة إمكانية إزالتها.



إعتماد زمن المزج على حجم المفاعل الحيوي

الحجم [L]	3	9	100	300	1 000	3000	24000
سرعة الدافعة [Upm]	750	2000	230	350	200	180	30
زمن المزج (ثانية)	5	3	6,6	5	25	20	66

القياس والضبط في تقانة المفاعل الحيوي

المعايير البيولوجية	المعايير الكيميائية	المعايير الفيزيائية
الفعاليات الأنزيمية	قيمة pH	الحرارة
المحتوى من الـATP	الأوكسيجين المنحل	الضغط
المحتوى من الـNADH	الأوكسيجين وثاني أوكسيد الكربون في غاز العادم	القوة المُدخلة
المحتوى من البروتين	تركيز المركب الأولي	اللزوجة
	تركيز المنتج	معدل جريان الهواء
	تركيز الأيونات	التلقيم بالمغذيات
		العكر
		وزن المفاعل الحيوي

المعايير المقاسة   المعايير المنظمة

• زراعة خلايا الثدييات (Cultivation of mammalian cells)

عموميات (General). تستخدم مزارع خلايا الثدييات تفضيلياً 1) لإنتاج اللقاحات (vaccines)، و2) لتصنيع بروتينات علاجية وتشخيصية، لا يمكن الحصول عليها من الكائنات الجهرية المأشوبة (recombinant). وهي تضم بروتينات تحتوي على عدد من الجسور ثنائية الكبريت (disulfide bridges)، التي تكون فعالة فقط بعد تعديلات معقدة تالية للترجمة، أو بروتينات تؤدي إلى حدوث استجابة مناعية بعد تناولها لفترة طويلة، وذلك بسبب إدخال الغلايكوزيد بشكل خاطئ عليها. والأمثلة تضم: الأجسام المضادة العلاجية، العامل الثامن (factor VIII)، الإيريتروبويتين، ومفعل البلازمينوجين النسيجي (tPA). إن تصنيع البروتينات المأشوبة في زرعة الخلايا الحيوانية هو عمل مكلف وذو متطلبات عالية تقانياً. لذلك، وكتقانة حديثة بديلة، جرت محاولات لإنتاج هذه الأنواع من البروتينات في حيوانات أو نباتات محورة وراثياً (transgenic). كما تم أيضاً دراسة مزارع نسيجية بشرية لتصنيع أنسجة بديلة من أجل الازدراع (transplantation) الطبي أو لاختبار الأدوية ومستحضرات التجميل (هندسة الأنسجة).

مزارع الخلايا البشرية (Human cell cultures). استخدمت لفترة طويلة مجموعات خلايا مأخوذة من نسيج إنساني منشورة على أوساط مغذية للتعرف على الفيروسات البشرية النوعية (human-specific viruses) وإكثارها، وكذلك لتصنيع لقاحات (vaccines) فيروسية. يمكن تخزين الخلايا البشرية في الطور الغازي لأوعية مبردة حتى درجة 120ºC-، وبذلك يمكن الحصول من مثل هذا المخزون على مزارع خلايا موحدة (متماثلة) طوال فترة زمنية طويلة. إلا أن فترة حياة هذه الخلايا الأولية محدود بحوالى 50 انقساماً خلوياً، وهي تتطلب حتماً سطحاً صلباً للنمو. ونتيجة لذلك، فإن العطاء من المادة الخلوية الناتجة بهذه الطريقة هو محدود. وعلى العكس، تملك الخطوط الخلوية المستمرة (الدائمة) القدرة على التكاثر بشكل غير محدود. والأمثلة على السلالات الخلوية المستمرة، خلايا هيلا (HeLa) وخلايا نامالفا (Namalva) المأخوذتان من سرطان عنق الرحم البشري ومن اللمفوما (lymphoma) على التوالي. أما الخلايا الجذعية (stem cells) الجنينية، بالرغم من أنها غير سرطانية، فهي أيضاً خلايا مستمرة، كونها قادرة على الانقسام بشكل غير محدود.

الخطوط الخلوية في التقانة الحيوية (Cell lines in biotechnology). تفيد الخطوط الخلوية المستمرة في إنتاج البروتينات العلاجية. إن السلالات الخلوية المستخدمة في الصناعة آتية أصلاً من أورام حيوانية. وهي تنقسم بلا حدود وتُظهر الخصائص التالية: 1) زمن تضاعف قصير بين 20 ـ 30 ساعة؛ 2) شروط زرع غير معقدة؛ 3) القابلية للنمو في معلق حتى كثافة خلوية عالية وبثباتية ملائمة ضد إجهادات الجز (shear stress)، ما يسمح بزرعها في مفاعلات حيوية كبيرة؛ و4) توفر نواقل (vectors) للتحويل. ولهذا الغرض، تستخدم حالياً بشكل أساسي الخلايا التالية: 1) خلايا ورمية هجينة فأرية لتصنيع أجسام مضادة وحيدة النسيلة (من أجل تطبيقات التشخيص تفضيلياً)؛ 2) خلايا أرومة ليفية (fibroblast) من مبيض الهامستر الصيني (خلايا CHO)؛ و3) خلايا ورمية من كليات طفل الهامستر السوري (خلايا BHK). إن خلايا CHO أو BHK تستخدم بشكل واسع للتعبير عن بروتينات مأشوبة، مثل، مفعل البلازمينوجين النسجي (tPA)، الإيريتروبويتين (erythropoietin (EPO)) أو العامل الثامن (factor VIII). كما تؤمن هذه الخلايا منتجات ذات تعديل تالٍ للترجمة (post translational modification) مشابه جداً للبروتين البشري الأصلي، خاصة لناحية إضافة الغلايكوزيد (glycosidation).

نواقل الكلونة (cloning vectors). تستخدم أنماط مختلفة من النواقل لتحضير خلايا حيوانية مأشوبة ثابتة وراثياً. وهي تندمج جميعها ضمن جينوم الخلية المستهدفة، ويمكن أن تحمل تسلسلاً لتحريض خارجي. تستخدم عادة نواقل مكوكية (shuttle vectors) قادرة على تحويل (transform) الـ *E.coli* التي تمثل الكائن المضيف لأمثلة الناقل. وفي التجارب المخبرية، تُستَخدم واسمات نموذجية لانتقاء الخلايا المتحولة، وهي عبارة عن بروتينات تمنح المقاومة ضد مكونات سامة في الوسط مثل النيومايسين (neomycin) وأملاح الكادميوم (Cd). أما في التطبيقات الصناعية فلا يمكن استخدام مثل هذه العوامل. لذلك وكبديل عنها، يستخدم الدي هيدروفولات ريدكتاز (dehydrofolate reductase (DHFR)) مندمجاً مع خلايا مضيفة معوزة الـ dhfr (مثلاً، خلايا -CHO K1) كواسم مفضل. يثبَط الـ DHFR بشكل تنافسي بالميثوتريكسات (methotrexate)، مضاهئ حمض الفوليك (folic acid analog)، مما يؤدي إلى اضطراب تصنيع الثايميدين (thymidine). وبالتالي، تكون الخلايا المحولة المعوزة للـ dhfr والعونية التغذية[16] (auxotrophic) للثايميدين قادرة على النمو في الوسط الفقير الذي يحتوي على الميثوتريكسات بعد تعدائها (transfection) بناقل DHFR. كما تُضخم هذه الخلايا جين الـ dhfr الغريب المربوط بالـ DNA المتمم (cDNA) لجين المنتج المرغوب. يبيّن الشكل في **الصفحة المقابلة** بنية ناقلين مستخدمين في الإنتاج الصناعي للعامل الثامن ومفعل البلازمينوجين النسجي.

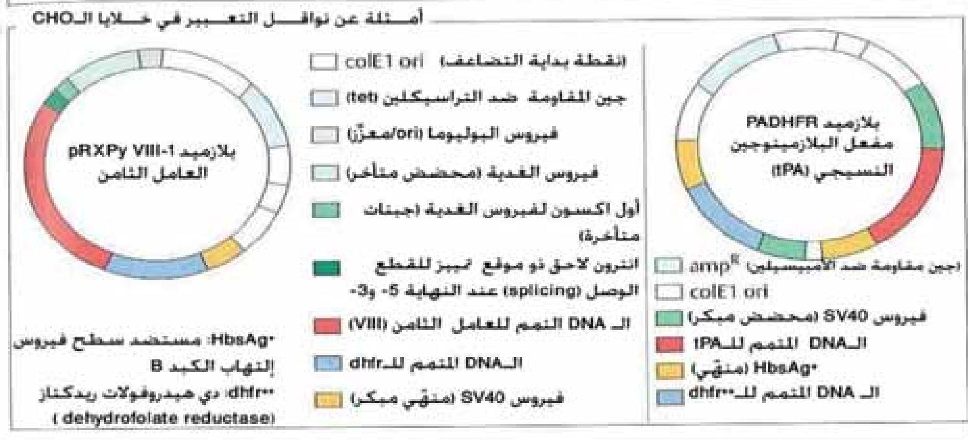
(16) الكائن الحي العوني أو التكميلي عبارة عن طفرة في كائن يفتقر إلى ممر أيضي واحد موجود في السلالة الأم، لا يتضاعف في وسط ذي مكونات دنيا، إنما يتطلب نموه إضافة مركب معين.

الخطوط الخلوية الدائمة المستخدمة عادة

الخط الخلوي	الأصل	التطبيقات/الاستخدامات
Namalva	ورم ليمفاوي بشري	انترفيرون
BHK	كلية صغير الهامستر	العامل VIII
CHO	مَبيض الهامستر الصيني	tPA, EPO, FMD طعم الفيروس
Sp 2/0 mouse hybridoma	ميلوما الفأر*	أجسام مضادة أحادية النسيلة
BS-C-1 vero cells	كلية القرد الأولية	طعوم بشرية

*ميلوما الفأر: mouse myeloma: ورم خبيث في نقي العظم





واسمات الانتقاء والتضخيم

جين واسم على ناقل التعبير	المكون في الوسط المغذي	انتقاء/تضخيم	ملاحظات
نيومايسين فوسفوترانسفيراز (neomycin phosphotransferase)	نيومايسين	انتقاء الخلايا المقاومة للنيومايسين	غير مناسبة لأوساط الإنتاج
ميتالوتيونين (metallothionein)	أيونات الكادميوم	انتقاء الخطوط الخلوية المقاومة للكادميوم	للاستخدام في العمل البحثي
ديهايدروفولات ريدكتاز (DHFR)	ثايميدين وميثوتريكسات (methotrexate) (مثبط DHFR)	انتقاء الخطوط الخلوية المكملة لـ dhfr، التضخيم بالميثوتريكسات	شائعة الاستخدام في الإنتاج

• المفاعلات الحيوية لخلايا الثدييات

(Mammalian cells bioreactors)

عموميات (General). في العقود الأخيرة، جرى تطوير بروتوكولات عديدة لزراعة خلايا الثدييات على المستوى المخبري، حيث تمت أمثلة الأوساط المغذية بشكل خاص. ولأنه لا يمكن لبروتينات مأشوبة مختلفة، مثل الأجسام المضادة البشرية أو المؤنسنة، والعامل الثامن (factor VIII)، وبعض أشكال مفعل البلازمينوجين النسيجي (tPA)، أن تُنتَج بنوعية وكمية كافية إلا في زرعة الخلايا الثديية، فقد تم رفع مستوى إنتاج عمليات التصنيع التي تعتمد على خلايا الثدييات إلى أكثر من 10000L. وضمن هذا السياق، تلعب جوانب معينة في هندسة العمليات الحيوية كالمزج والتهوئة دوراً مفتاحياً.

الأوساط المغذية (Nutrient media). إلى جانب التزويد الجيد بالأكسيجين وثاني أوكسيد الكربون، فإن التزويد الكافي بالمكونات المغذية هو على غاية من الأهمية. يفضل الغلوكوز كمصدر كربوني، لكنه يجب أيضاً إدخال أحماض أمينية، وفيتامينات، ونيوكليوتيدات، وبروتينات، وأحماض دهنية، وأملاح لاعضوية (inorganic salts) ومواد حاضّة على النمو في الأوساط المغذية. لقد كانت غالبية المزائج المغذية القديمة تحتوي على مصل جنين العجل كمصدر معقد لمحضضات النمو. أما اليوم، فإن الأوساط الخالية من المصل هي المستخدمة، وهي أرخص وأكثر قبولاً لناحية القلق على خير الحيوان. تحتوي هذه الأوساط على إضافات من ألبومين مصل البقر، والإنسولين، والترانسفيرين، والإيثانولامين والسيلينيت (مثلاً، وسط ITES). كما تضاف إليها البيكاربونات لضبط درجة الرقم الهيدروجيني (pH) في الخلايا، أو يتم تنفيذ التجارب بالتعرض لثاني أوكسيد الكربون في الجو.

الإجراءات المخبرية. تُنمى الخلايا في المختبر بشكل تفضيلي في دوارق دائرية (roller flasks) أو دوارق T، (tissue flasks). ولأحجام أكبر تصل حتى 10 L فتستخدم دوارق غازلة. يصل تركيز الخلايا في هذه الدوارق إلى 10^6-$2x10^6$ cell mL^{-1}.

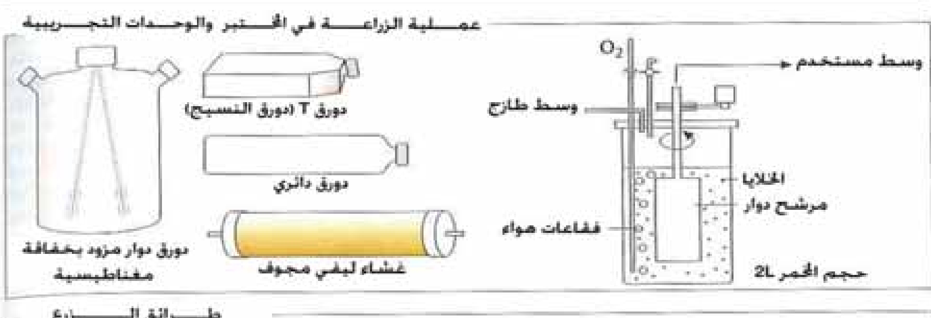
المفاعل الخلوي (Cell reactor). يجب الانتباه أثناء رفع مستوى الإنتاج في المفاعل الخلوي إلى إمكانية زيادة المحتوى من المستقلبات (metabolites) السامة عند الزرع بطريقة الدفعة (batch) أو الدفعة المغذاة (fed-batch)، وتثبيط تشكل المنتج المطلوب. في مزارع التروية (perfusion cultures)، يتم تعويض الوسط المستنزف (المستهلك) بمحلول مغذٍ طازج. إلا أنه في عمليات التخمير الصناعية، تفضل بروتوكولات الدفعة المغذاة كونها تنقص خطر حدوث تلوث. وبسبب وجود الخلايا بشكل معلق، فإن التزود بالأكسيجين والثبات تجاه إجهاد الجز (shea stress) هو مسألة هامة، لكن هناك متطلبات أخرى يجب تحسينها. إن قيم k_La لتزود الخلايا الحيوانية بالأكسيجين هي حوالى $2.2h^{-1}$، أي أقل بـ 1 ـ 2 ضعف من قيم k_La للكائنات المجهرية. كما تمت دراسة مجموعة واسعة من النظم غير المباشرة للتزود بالأكسيجين، مثل، أغشية السيليكون شبه النفوذة. فعلى سبيل المثال، تم التوصل لفعالية نقل أكسيجين قدرها $120gm^{-3}$ في مفاعل حيوي بحجم 1000L مجهز بنظام غشاء دوار (rotating membrane system)، باستعمال ضغط غشاء داخلي وصل حتى 6 bar. والمهمة الهامة الأخرى، فتتمثل بالاستثمار الكامل للمواد المغذية الباهظة الثمن. فبالنسبة إلى تجارب التروية، يتم حجز الخلايا بواسطة غشاء ترشيح ذي مسام دقيقة، ومتى تم التوصل لكثافة الخلايا المطلوبة تبدأ متابعة المنتج بشكل مستمر وحثيث. لقد تم الحفاظ على مزارع من هذا النوع في حالة توازن لأكثر من 900 ساعة، إضافة إلى الحصول على عطاء إنتاج ثابت لأكثر من 30 يوماً، وذلك باستخدام خلايا مثبتة على حوامل من كرات دقيقة (microbead) ذات سطح داخلي واسع، مثلاً، مصنوعة من السيليكون المسامي. في الختام، وفي تقنيات الإنتاج الحديثة التي تمت أمثلتها حتى مستوى يفوق 10000L، تستخدم إجراءات الدفعة المغذاة فقط، بحيث تكون الخلايا معلقة في وسط خالٍ من المصل.

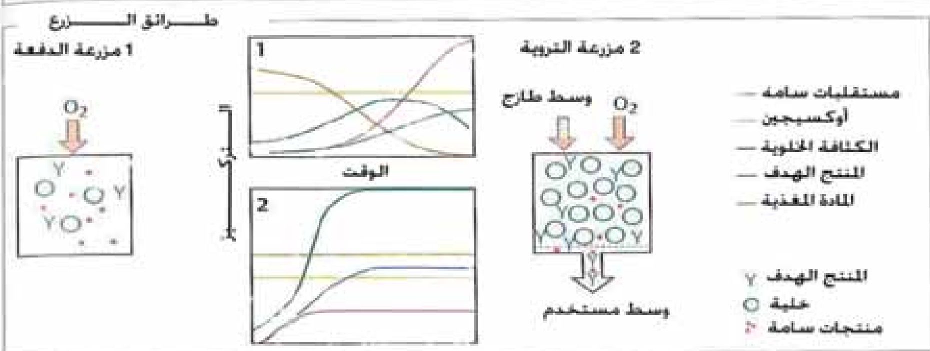
تنقية المنتجات. خلافاً لحالة استرجاع (recovery) غالبية المنتجات الميكروبية، إن استرجاع منتجات خلايا الثدييات لا يتطلب تحطيم الخلايا لأن المنتجات المرغوبة تُفرز في وسط المزرعة. إلا أنه يجب اتباع بروتوكولات تنقية طويلة للوصول لمنتج عالي النقاوة، حيث يكون ضبط النوعية ذا أهمية مفتاحية. قد تتضمن خطوات الاسترجاع التنقية بالألفة (affinity). في حين يتم التثبت من هوية البروتين المنتج باستخدام الخرائط الببتيدية، سَلسَلة الأحماض الأمينية الطرفية (terminal amono acids sequencing)، MALDI-TOF[17]، وطرقاً أخرى؛ كما يجب إثبات غياب DNA جين ورمي (oncogenic) أو جين قابل للتحويل (transformable) وذلك بأن لا يتعدى تركيزه 100pg (10^{-10}g) في جرعة المنتج المعد لإنتاج المستحضرات الدوائية؛ بالإضافة إلى ضرورة خلو المنتج من RNA الفيروس القهقري (retrovirus).

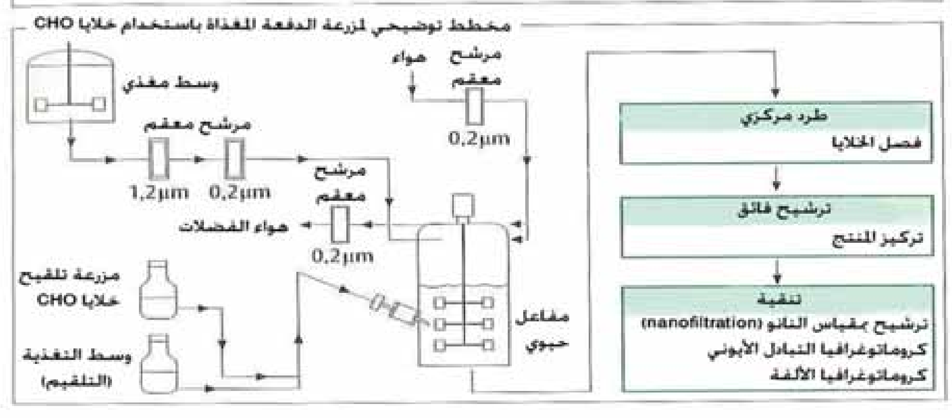
---

(17) اختصار: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight أي التفاظ/ تأين ليزري مساعَد بقالب. وهي طريقة تحليل طيف كتلة مواد حساسة نسبياً كالبروتينات والببتيدات والبوليميرات الحيوية والسكاكر. تعتمد على التأين المعتدل بواسطة شعاع ليزري معلوم وقالب لحماية الجزيء الحساس المدروس.

أوساط المغذيات	
أوساط تحوي مصلاً	**أوساط لا تحوي مصلاً**
غلوكوز ، غلوتامين	غلوكوز ، صوديوم البيروفات، غلوتامين
أحماض أمينية	أحماض أمينية
مصل جنين العجل	ألبومين مصل البقر ، إنسولين، ترانسفيرين(transferin)، إيثانولامين (ethanolamine)، سيلينيت (selenite) (الوسط ITES)
معادن	معادن
تزويد بالـ CO_2 و O_2	تزويد بالـ CO_2 و O_2







المفاعلات الأنزيمية والخلوية

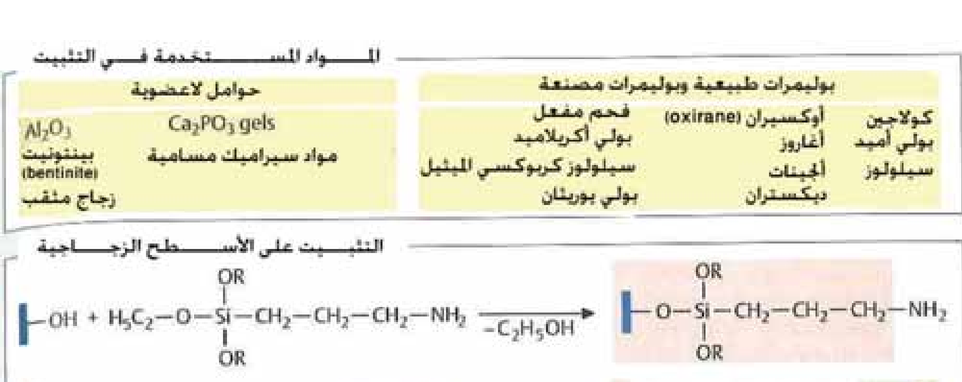
(Enzyme and cell reactors)

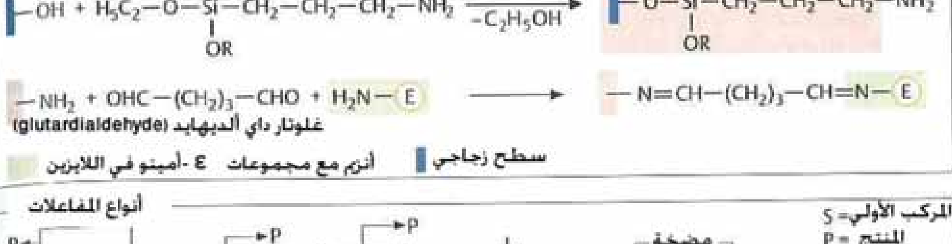
عموميات (General). تثبت عادة المحفزات الحيوية (biocatalysts) المستخدمة في العمليات الصناعية على حوامل، وذلك لزيادة ثباتيتها وحفظ الكلفة. في حالة التحويل الحيوي (biotransformation) ذي الخطوة الواحدة، تمثل الأنزيمات المحفزات الحيوية المفضلة. أما إذا كان التحويل الحيوي المتعدد الخطوات مطلوباً، أو إذا كانت الأنزيمات داخل الخلوية (intracellular) صعبة التنقية إلى حدٍ كافٍ، فإنه يفضل تثبيت الخلايا الميكروبية الكاملة. كما يتم في بعض الأحيان، تعطيل الخلايا، وذلك بشروط حافظة للفعالية الأنزيمية المرغوبة.

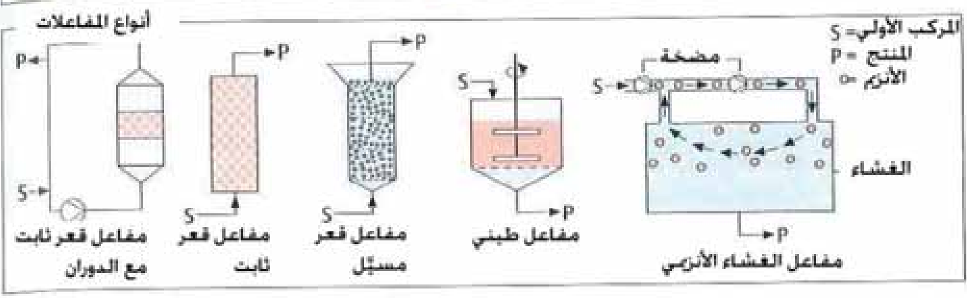
كيمياء التثبيت (Chemistry of immobilization). غالباً ما يكون ادمصاص (adsorption) الأنزيمات أو الخلايا على أسطح مشحونة إجراءاً يمكن الاكتفاء به: ولهذا الغرض، هناك مجموعة واسعة من المواد المبادلة للأيونات (ion-exchange) متاحة. فعندما يكون مفضلاً تثبيت الأنزيم تشاركياً (covalently)، يمكن استخدام ثلاث طرق أساسية: 1) تشابك سطح مجموعات ε ـ الأمينية (ε-amino groups) الموجودة في اللايزين (lysine) مع الغلوتارداي‌ألدهايد (glutardialdehyd)، لإعطاء الأزوميثين (azomethines) التي يمكن تثبيتها أكثر بالهدرجة (hydrogenation) بواسطة بوروهايدرايد الصوديوم (sodium borohydride)؛ 2) التشابك مع داي إيزوسيانات (diisocyanates)؛ و3) الارتباط بإيبوكسيدات بوليمرية (polymeric epoxides) (كالأوكسيسيران (oxiranes)). لقد تمت دراسة حوامل عديدة لاعضوية (inorganic) وعضوية كمواد مشكلة للقوالب. ومن أجل إدخال الخلايا ضمن المادة الحاملة، يتم مزج البوليميرات الأولية (prepolymers) مع الخلايا، ثم يجري إخضاع هذا المزيج لبلمرة جذرية (radical) أو كيميائية ضوئية (photochemical). على سبيل المثال، يمكن إدخال الخلايا (أو الأنزيمات) في هلام البولي أكريلاميد بمزجها مع الأكريلاميد، لتتم بعدها إضافة الميثيلين بيس أكريلاميد N، (N'-methylene bisacrylamide) وبيرسلفات البوتاسيوم (potassium persulfate). أما في البلمرة الكيميائية الضوئية فتُستخدم بوليمرات الأوريثان الأولية (urethane prepolymers) ومواد أخرى. ومن أجل التغليف الدقيق (microincapsulation) للأنزيمات أو الخلايا، يمكن بلمرة بوليمر أولي مناسب في الطور الحاوي على الأنزيم أو الخلايا، والفاصل بين الماء والمذيب العضوي الذي لا يمتزج مع الماء. كما يمكن استخدام، في تثبيت أنزيمات المنظفات، البوليمرات المنحلة في الماء مثل البولي إيثيلين غلايكول (polyethylene glycol)، أو استخدام طريقة شائعة أخرى تعتمد على هلامات الأيونوتروبيك (ionotropic) كالألجينات (algenate) التي تشكل هلاماً بوجود أيونات الكالسيوم (Ca^{2+}). وكذلك أيضاً، تم وصف طريقة تحاك فيها الأنزيمات والخلايا ضمن ألياف، مثلاً، ضمن مشتقات السيلولوز أو الكولاجين.

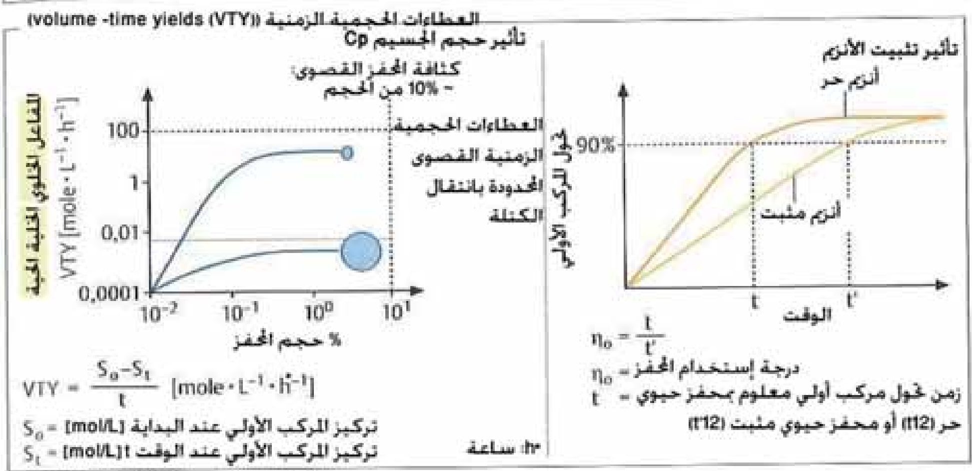
خصائص المحفزات الحيوية المثبتة (Propertie of immobilized biocatalysts). يمكن أن تتغير خصائص المحفزات الحيوية إثر التثبيت، حيث إن فعالية التحفيز (catalytic efficiency) لا تتعلق بالمحفز فقط ولكن أيضاً بنقل الكتلة الذي يعتمد على خصائص قالب التثبيت المستخدم. لذا تم تطوير قواعد تجريبية لأمثلة المحفز المثبت، وكذلك تعبئة المفاعلات الحيوية وعطاءاتها الحجمية الزمنية (volume-time yields). تأخذ هذه القواعد في الحسبان، إلى جانب الخصائص الضرورية للمحفز مثل V_{max} وK_M، معايير حجم الجسيم ونقل الكتلة. كما تعتبر ثباتية التشغيل للمحفز الحيوي المثبَت من الصفات المفتاحية. ففي حالات التثبيت الملاءمة، يمكن أن يبقى الأنزيم فعالاً لعدة شهور (أسبارتاز (aspartase)، مصاوغ ـ إيزوميراز ـ الغلوكوز (glucose isomerase)، أسيلاز بينسيلين (penicillin acylase)).

نوع المفاعل وتقانة العملية (Reactor type and process technology). تمت هندسة مفاعلات الأنزيمات والخلايا كمفاعلات أغشية؛ (membrane reactors) أو كمفاعلات غير مستمرة (discontinuous) أو مستمرة: مثل مفاعلات القعر الثابت (fixed-bed)، أو القعر المسيَّل (fluidized-bed)، أو مفاعلات العمود الليفي المجوف (hollow-fiber column reactor) وبالإضافة إلى ثباتية المحفز الحيوي وأمثلة نقل الكتلة، فإن العمليات السابقة واللاحقة هي على درجة من الأهمية لتحقيق اقتصاديات جيدة. تضم هذه العمليات تحضير المركبات الأولية (substrates)، كبح التفاعلات الجانبية، وتطوير بروتوكول استرجاع مناسب لاستخدام المنتج. كما يجب أن يكون المخطط الكلي متين، وبسيط التشغيل، ومؤمثلاً لتأمين إمكانية استثمار وكلف تشغيل بالحد الأدنى. إضافةً إلى ذلك، تعتبر مواضيع القياس والرقابة مواضيع مفتاحية. فمن أجل أحجام كبيرة من المنتجات، كالإيزوميروز (شراب الذرة عالي المحتوى من الفروكتوز (high-fructose corn syrup (HFCS)) أو حمض 6 ـ أمينوبينسيلانيك (6-aminopeniillanic acid)، تفضل محطات التشغيل المستمرة. لهذا الغرض، تستخدم عدة مفاعلات حيوية على التوازي، ولكن مع إضافات متعاقبة من المحفز؛ وعليه يمكن استبدال الوحدة التي استنفدت فعاليتها المحفزة بدون انقاص الإنتاجية الإجمالية للمحطة. أما بالنسبة إلى إنتاج كميات أقل من منتجات مثل حمض الأسبارتيك ذي الوضعية L، (L-aspartic)، فيمكن لمفاعل خلايا منفردة من الـ *E.coli* المثبتة أن يكفي لدورة تشغيل.









$$VTY = \frac{S_0 - S_t}{t} \quad [mole \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}]$$

S_0 = [mol/L] تركيز المركب الأولي عند البداية

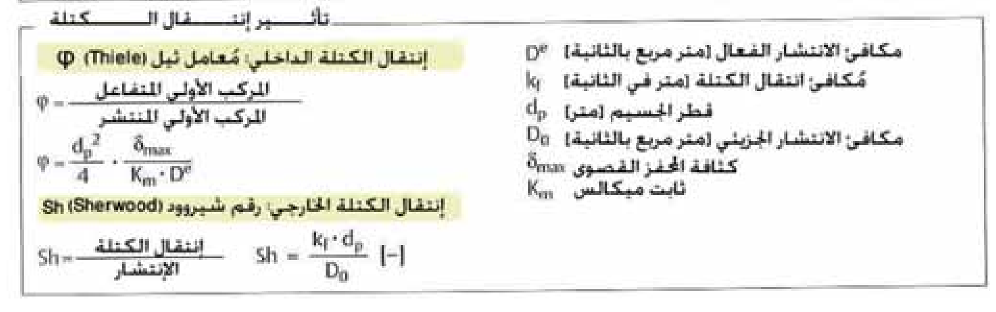
S_t = [mol/L]t تركيز المركب الأولي عند الوقت

h: ساعة

$$\eta_0 = \frac{t}{t'}$$

η_0 = درجة إستخدام المحفز

t = زمن تحول مركب أولي معلوم بمحفز حيوي حر (t12) أو محفز حيوي مثبت (t'12)



تأثـــير إنتـــقال الـــكتلة

إنتقال الكتلة الداخلي: مُعامل ثيل (Thiele) Φ

$$\varphi = \frac{\text{المركب الأولي المتفاعل}}{\text{المركب الأولي المنتشر}}$$

$$\varphi = \frac{d_p^2}{4} \cdot \frac{\delta_{max}}{K_m \cdot D^e}$$

إنتقال الكتلة الخارجي: رقم شيروود Sh (Sherwood)

$$Sh = \frac{\text{إنتقال الكتلة}}{\text{الإنتشار}} \qquad Sh = \frac{k_f \cdot d_p}{D_0} \quad [-]$$

D^e مكافئ الانتشار الفعال [متر مربع بالثانية]

k_f مُكافئ انتقال الكتلة [متر في الثانية]

d_p قطر الجسيم [متر]

D_0 مكافئ الانتشار الجزيئي [متر مربع بالثانية]

δ_{max} كثافة المحفز القصوى

K_m ثابت ميكالس

- **استرجاع المنتجات الحيوية (Recovery of bioproducts)**

عموميات (General). تكون المنتجات الحيوية الناتجة من عمليات التخمير إما خلوية (كتلة خلوية، بروتينات داخل خلوية (intracellular)، أجسام ضمنية[18] أو خارج خلوية (أحماض أمينية، مضادات حيوية، أنزيمات). في عمليات التخمير التقليدية، يكون غالباً تركيز المنتج منخفضاً (أقل من 10٪، وغالباً أقل من 1٪). بينما في العمليات المستخدَم فيها كائنات مجهرية مهندسة وراثياً، فيتم الحصول على نسب أعلى من المنتج (مثلاً، يُنتَج حتى 50٪ بروتين في كتلة الخلايا الرطبة). من أجل عزل المنتجات الحيوية النقية، يجب أن يكون تسلسل خطوات التركيز والتنقية ملائمة لطبيعة الاستخدام المرغوب للمنتج. لذا، فإن المستحضرات الدوائية والتشخيصية تتطلب بروتوكولات تنقية معقدة، في حين أن الأنزيمات التقانية هي غنية بخطوات عمل أقل وأبسط. يمكن أن تتجاوز نسبة ضياع المنتج أثناء التنقية 50٪، ما يشير إلى أهمية البروتوكولات الجيدة لإنتاج اقتصادي. كما ويعد التخلص من الفضلات الناتجة بشكل آمن وغير مكلف مهمة أخرى ذات أهمية اقتصادية وبيئية.

الكتلة الخلوية (Cell mass). إن صناعة خميرة الخباز هي مثال جيد على تحضير الكتلة الحيوية الميكروبية. فبعد انتهاء التخمير، يتم فصل الخلايا بالطرد المركزي، ثم يتم غسلها وترشيحها عبر صفيحة تحت الضغط أو عبر مرشح دوار تحت التفريغ؛ ليتم بعدها تعبئة المنتج الرطب. أما خميرة الخبار الجافة، فتُنتج من الخميرة الرطبة بواسطة دوامة (cyclone)، بحيث يمكن أن تحفظ لفترة أطول بكثير. ومن الطرق المستخدمة في فصل الخلايا أيضاً، الترشيح الانفكاكي والترشيح بالجريان التصالبي ـ المستعرض ـ.

المنتجات داخل الخلوية (Intracellular products). إن المنتجات المستهدفة هي عادة بروتينات داخل خلوية توجب تمزيق الخلايا المفصولة بدون تعطيل البروتينات. تستخدم غالباً لهذه الخطوة طرائق ميكانيكية مثل المجانسات ذات الضغط العالي أو الطاحنات الكروية. ولإنتاج خلاصة الخميرة، يتم تنشيط بروتياز داخل خلوي عند الخميرة ما يؤدي إلى تحطم الخلية. وعلى المستوى المخبري، تستخدم غالباً الأمواج فوق الصوتية في أحواض مبردة. كما يمكن أيضاً استخدام الليزوزيم أو أنزيمات حالة أخرى مع مواد مخفضة للتوتر السطحي لطيفة. أثناء عملية التخمير المستخدم فيها خلايا الـ *E.coli* المأشوبة، تشكل البروتينات المستهدف إنتاجها في أغلب الأحيان أجساماً ضمنية (inclusion bodies) تحتوي على جسور ثنائية السلفيد خاطئة. وتبعاً للتسلسلات الموجهة[19] المستخدمة يمكن أن تتشكل الأجسام الضمنية في الفراغ المحيط بغشاء البلازما أو في العصارة الخلوية (cytosol)؛ بحيث يتم عزلها بعد تكسير لطيف للخلايا بالطرد المركزي التجزيئي. في البداية، تتم أكسدة الأشكال المختزلة من هذه الأجسام (من السيتوبلازم) بعملية حل سلفيتي مؤكسِدة؛ بعدها تَختزل مركبات السلفونات ـ S، -S) (sulfonates الناتجة بواسطة كواشف ثيول (بكونها أشكالاً مؤكسَدة من الأجسام الضمنية في الفراغ المحيط بغشاء البلازما)، ثم تُمسخ البروتينات باليوريا أو بكواشف شبيهة لتكسير الروابط الهيدروجينية. وفي خطوة الفصل بالانفكاك التالية، تتم إزالة اليوريا باستخدام شروط مؤكسِدة، ليُطوى ـ يلتف ـ (folding) جزء من البروتين بالشكل الصحيح. في النهاية، وباستخدام هذه العملية نادراً ما تتجاوز العطاءات الإجمالية للبروتين الفعال وظيفياً الـ 20٪.

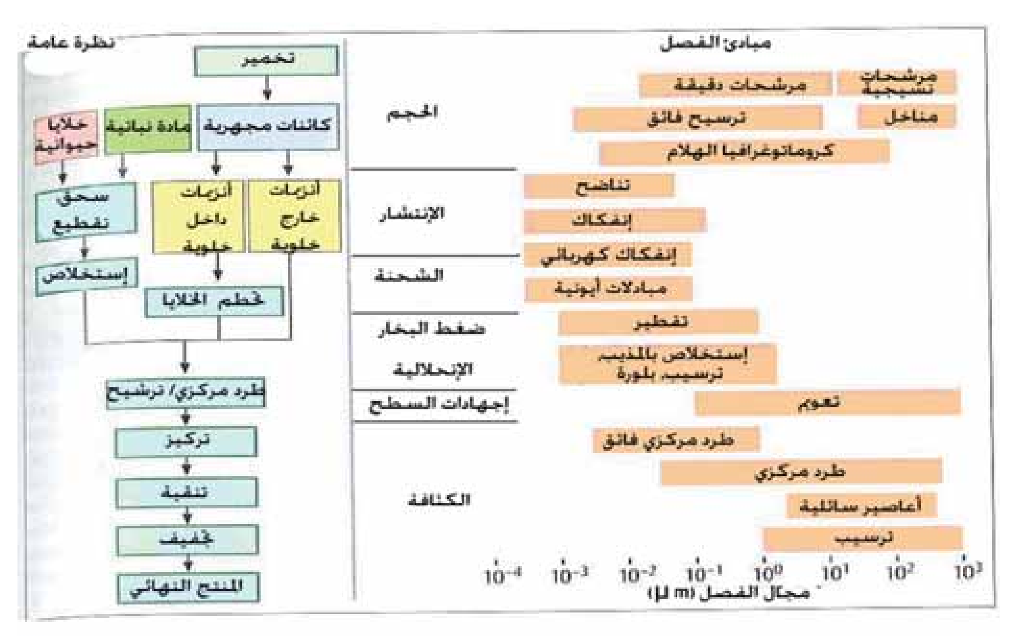
منتجات خارج خلوية (Extracellular products). يتم عادة ترسيب منتجات حيوية ذات وزن جزيئي منخفض مثل حمض الليمون والأحماض الأمينية في المرق (both) بعد إزالة الكتلة الخلوية. وهي تُنقَّى بشكل إضافي من خلال خطوات إذابة وترسيب تقود غالباً لمنتجاتٍ مبلورة. أما المنتجات من مضادات الحيوية، فتُعزل عادة بالاستخلاص المتعدد المراحل باستخدام المذيب N ـ بنتانويل الأسيتات أو N ـ بوتيل الأسيتات. ففي عملية عزل البروتينات الخارج خلوية، يتم عادة البدء بخطوة ترشيح فائق، تُتبع بالترسيب بالملح من خلال إضافة أملاح سلفات الأمونيوم أو سلفات الصوديوم، أو باستخدام تراكيز خفيفة (2 ـ 10٪) من مذيبات عضوية مبرَّدة مثل 2 ـ بروبانول (2-propanol). في الختام، غالباً ما تُستَخدم الأنزيمات التقانية بشكلها الخام (غير النقي) إما كسائل مركز أو بشكل رذاذ مجفف.

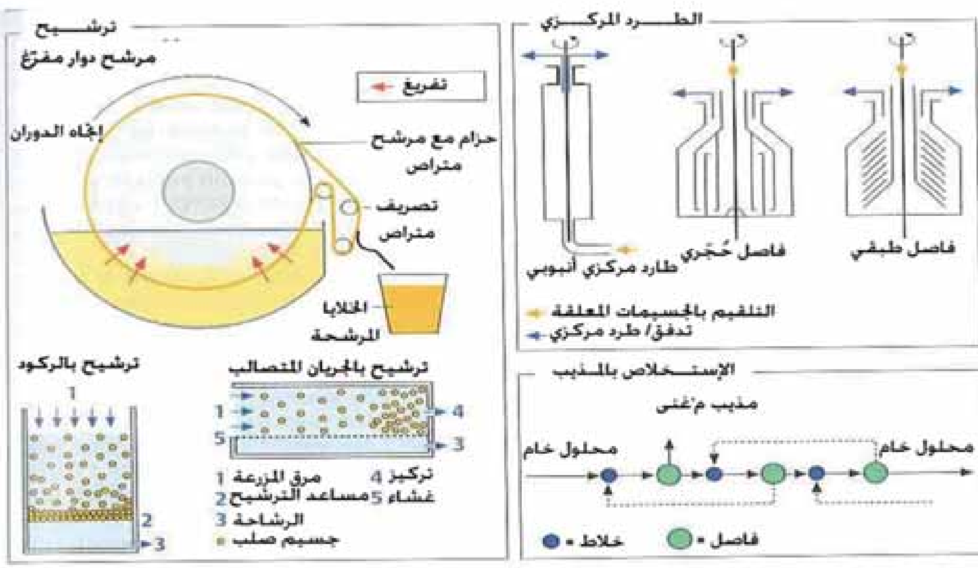
الإجراءات المضمنة (Integrated procedures). جرت عدة محاولات لتبسيط بروتوكولات العمل. في طريقة الادمصاص على قعر ممتد، يتم فصل الخلايا وتركيز المنتج بشكل متزامن باستخدام تحدر الكثافة ضمن قعر مسيَّل من مُدمَصات مبادِلة للأيونات أو ألفوية. وفي إجراء آخر، يعتمد على نظم ثنائية الطور ويتألف من طور مائي ملحي وطور من بوليمرات منحلة في الماء، تتوزع أجزاء الخلايا والبروتينات في أطوار مختلفة؛ وذلك لأن الطورين المؤلفين لهذا النظام لا يمتزجان. وبذلك يتم فصل البروتينات ليجري بعد ذلك استرجاع المنتج المنشود.

---

(18) الأجسام الضمنية أو المُشتَمَلة (Inclusion bodies): عبارة عن أجسام في سيتوبلاسما البكتيريا المولفة غير محاطة بغشاء، تمثل أحواض تخزين البروتينات المولفة المنتَجة التي تكون غالباً مثنية بشكل غير سوي (Misfolded).

(19) التسلسل الموجه (Leader sequence): هو تسلسل متغير الطول عند النهاية ´5 في جزيء رنا رسول، يسبق شفرة البدء AUG حيث تبدأ الترجمة وهو نفسه لا يترجم إلى بروتين.





الطرائق المعتمدة على الأغشية

	تناضح معكوس reverse osmosis	الترشيح الفائق ultrafiltration
المبدأ (principle)	النقل بالانتشار	فصل على أساس الحجم الجزيئي
دقائق محتجزة	M_R<500-1000	MR<1000
ضغط انتفاخي	0.8-10 m Pa	صغير جداً
ضغط عامل	1-15 m Pa	< 1 m Pa

• استرجاع البروتينات: الكروماتوغرافيا

(Recovery of proteins: chromatography)

عموميات (General). إن الكروماتوغرافيا هي خطوة هامة جداً في غالبية بروتوكولات التنقية. ويمكن حساب التصميم الأمثل للخطوة الكروماتوغرافية بمعادلة فان ديمتر. تصنف المواد التي تملأ عمود الكروماتوغافيا تبعاً لمبدأ الفصل: 1) في كروماتوغرافيا الهلام، يتم فصل المواد تبعاً لكتلتها المولية ـ الجزيئية ـ وشكلها؛ 2) في كروماتوغرافيا الامتصاص، تهيمن التفاعلات المتبادلة المحبة للماء والكارهة للماء؛ 3) في الكروماتوغرافيا التبادل الأيوني، يكون للسلاسل الجانبية المشحونة في الأحماض الأمينية أثر مفتاحي؛ 4) في كروماتوغرافيا التبئير، تهيمن نقطة توازن الشحنات في عملية الفصل؛ و5) في كروماتوغرافيا الألفة، يتم الفصل بالتفاعل المتبادل النوعي مع الروابط[20]. تتوفر لكل طريقة من هذه الطرق، أنواع عديدة من المواد المدمصة التجارية. كما يعتبر نظام AKTA™ جهازاً قيماً لانتقاء المادة المدمصة وبروتوكول الشطف الأكثر ملاءمة خلال ساعات قليلة. في المختبر، تنفذ عدة خطوات فصل كروماتوغرافي بضغط متوسط أو عالٍ (مثلاً، طريقة الكروماتوغرافيا السائلة السريعة للبروتينات). بينما على المستوى الإنتاجي، الذي تم التوصل إليه بزيادة حجم عمليات الكروماتوغرافيا، لا تتضمن إجراءات الكروماتوغرافيا فيه خطوات يستخدم فيها الضغط العالي.

كروماتوغرافيا الهلام (Gel chromatography). تستخدم فيها مواد حاملة هامة متوفرة تجارياً هي هلامات من الديكستران أو الأغاروز، التي يمكن تعديل قياس مسامها بالتشبيك. في هذا النوع من الكروماتوغرفيا يمكن استخدام المذيبات العضوية، وذلك بعد ألكَلة جزئية لمجموعات الهيدروكسيل بكواشف الألكلة.

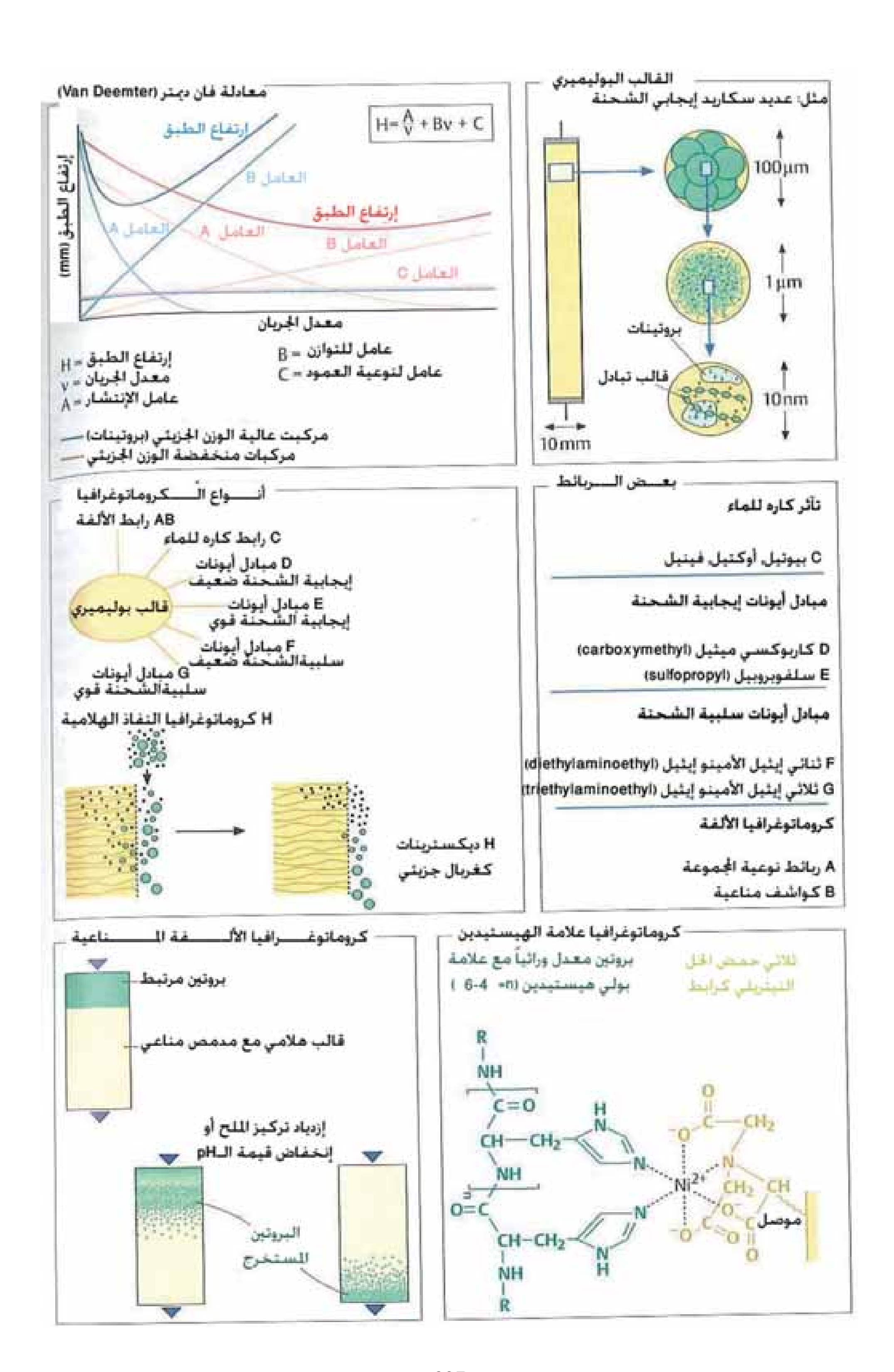
كروماتوغرافيا الادمصاص (Adsorption chromatography). ويستخدم فيها بشكل واسع المادة المحبة للماء؛ الهيدروكسي أباتيت. أما الكروماتوغرافيا الكارهة للماء، فتُنفذ عادة باستخدام هلامات السيفاروز التي تم تشكيل مشتقات لها بواسطة مجموعات البوتيل، أو الأوكتيل، أو الفينيل. وهي تسمح بتنقية البروتينات الكارهة للماء عبر تفاعل هذه البروتينات المتبادل مع المواد المدمصة الكارهة للماء.

كروماتوغرافيا التبادل الأيوني (Ion-exchange chromatography). تُستخدم المبادِلات الأيونية كثيراً في تنقية البروتينات، حيث إنها فعّالة ويمكن رفع مستوى استخدامها بسهولة. تستخدم فيها غالباً البوليمرات المسلفنة أو المضاف إليها مجموعة كربوكسيل كمبادلات أيونية موجبة، بينما تعتمد غالباً مبادلات الأيونات السالبة على بوليمرات تضم مجموعات أمينية رباعية. ولتشكل الداعم البوليميري، تُستخدم عديدات السكاريد والبوليمرات المصنعة. في هذا النوع من الكروماتوغافيا، يقوم مبدأ الفصل على الفرق في الشحنة العامة لمختلف البروتينات، حيث يتم الشطف بزيادة تركيز الملح أو تغيير قيمة الرقم الهيدروجيني (pH).

كروماتوغرافيا الألفة (Affinity chromatography). تعتمد هذه الطريقة على التفاعل المتبادل للبروتينات برابط نوعي مقترن بالمادة الحاملة. فلتنقية الديهيدروجيناز ـ نازعة الهيدروجين ـ مثلاً، تم استخدام أصبغة مقرونة بالديكستران ملائمة لتتموضع في جيب ارتباط الـ NADH في هذه البروتينات. إن الكروماتوغرافيا المناعية، هي تقانة مكلفة جداً، تستخدم أحياناً في التنقية الصناعية للبروتينات الدوائية مثل العامل الثامن (favtor VIII). وإن الحامل المستخدم فيها هو عبارة عن أجسام مضادة وحيدة النسيلة نوعية (متخصصة) بهذا البروتين. أما شطف القالب فيتم باستخدام روابط منافسة ذات وزن جزيئي منخفض، أو عن طريق رفع تركيز الملح أو خفض الرقم الهيدروجيني (pH). في أغلب الأحيان، وعلى مستوى تطبيقي صغير، تتم تنقية البروتينات المأشوبة باستخدام روابط ألفوية أُدخلت على البروتين بالهندسة الوراثية لهذا الغرض. أحد الأمثلة على ذلك، البروتينات المندمجة مع بروتين مساعد سهل التنقية مثل الستربتافيدين (يُنقّى عبر حامل يحمل رابط البيوتين). تقانة أخرى مفيدة، تتمثل بإضافة ذيل البولي هيستسدين (his_n، n=4-6) إلى النهاية الأمينية أو الكاربوكسيلية للبروتين؛ حيث يمكن تنقية البروتينات المعدلة بمثل هذه الثمالة بانتقائية عالية على كروماتوغرافيا الألفة ذات قالب للحامل مكون من المعدن (كروماتوغرافيا الألفة الذات معادن مثبتة IMAC = Immobilized metal affinity chromatography) كالـ Ni^{+2} بشكل تفضيلي، أو Cu^{+2}، أو Zn^{+2}، أو Fe^{+2}، أو Fe^{+3} التي تُستخدم كمعادن مخلبة مرتبطة بالقالب. وهكذا، إذا أدخلت أماكن قص عالية النوعية (التخصص) بالبروتياز مثل العامل العاشر بشكل متاخم لهذه العلامة من الهيستيدسن، أمكن إزالة العلامة بشكل انتقائي بعد التنقية. وكذلك أيضاً، لقد تم بطرق وراثية إدخال ببتيدات أخرى في البروتينات كعلامات، مثل، إدخال تسلسل موضع ربط البيوتين في الستربتافيدين، ما يسمح بالتنقية على عمود معدل بالستربتافيدين. تجدر الإشارة إلى أنه عادة ما يتم ربط البروتين المندمج أو الببتيد العلامة بطريقة تسمح بإزالتهما ببروتياز نوعي بعد التنقية.

---

(20) الرابط (Ligand) عبارة عن جزيء صغير يرتبط بالبروتين بقوى غير تساهمية.



معادلة فان ديمتر (Van Deemter)
$H=\frac{A}{v}+Bv+C$
إرتفاع الطبق (mm)
إرتفاع الطبق
العامل B
إرتفاع الطبق
العامل A
العامل A
العامل B
العامل C
معدل الجريان
H = إرتفاع الطبق
v = معدل الجريان
A = عامل الإنتشار
B = عامل للتوازن
C = عامل لنوعية العمود
مركبت عالية الوزن الجزيئي (بروتينات)
مركبات منخفضة الوزن الجزيئي
القالب البوليميري
مثل: عديد سكاريد إيجابي الشحنة
100µm
1µm
بروتينات
قالب تبادل
10nm
10mm
أنـــواع الــكـروماتوغرافيا
AB رابط الألفة
C رابط كاره للماء
D مبادل أيونات إيجابية الشحنة ضعيف
E مبادل أيونات إيجابية الشحنة قوي
قالب بوليميري
F مبادل أيونات سلبيةالشحنة ضعيف
G مبادل أيونات سلبيةالشحنة قوي
H كروماتوغرافيا النفاذ الهلامية
H ديكسترينات كغربال جزيئي
بعـض الـروابط
تأثر كاره للماء
C بيوتيل أوكتيل فينيل
مبادل أيونات إيجابية الشحنة
D كاربوكسي ميثيل (carboxymethyl)
E سلفوبروبيل (sulfopropyl)
مبادل أيونات سلبية الشحنة
F ثنائي إيثيل الأمينو إيثيل (diethylaminoethyl)
G ثلاثي إيثيل الأمينو إيثيل (triethylaminoethyl)
كروماتوغرافيا الألفة
A روابط نوعية المجموعة
B كواشف مناعية
كروماتوغرافيا الألـــفة المـــناعية
بروتين مرتبط
قالب هلامي مع مدمص مناعي
إزدياد تركيز الملح أو إنخفاض قيمة الـpH
البروتين المستخرج
كروماتوغرافيا علامة الهيستيدين
بروتين معدل وراثياً مع علامة بولي هيستيدين (n= 4-6)
ثلاثي حمض الخل النيتريلي كرابط
موصل

● الجوانب الاقتصادية للعمليات الصناعية

(Economic aspects of industrial procees)

عموميات (General). من أجل التطبيقات الصناعية، تتم أمثلة عمليات التقانة الحيوية مع وضع الاعتبارات الاقتصادية نصب العين. فالأهداف المفتاحية تضم عادةً 1) تطوير عملية بسيطة ومتينة؛ 2) إبقاء عدد العاملين وكلف الاستثمار منخفضة؛ 3) الحصول على عطاءات عالية في زمن قصير باستخدام مواد أولية متوفرة غير مرتفعة الثمن وذات نوعية ثابتة مع الحفاظ على كلف طاقة منخفضة؛ و4) إبقاء الكلف البيئية منخفضة (كلف التخلص من النفايات ومعالجة مياه الفضلات).

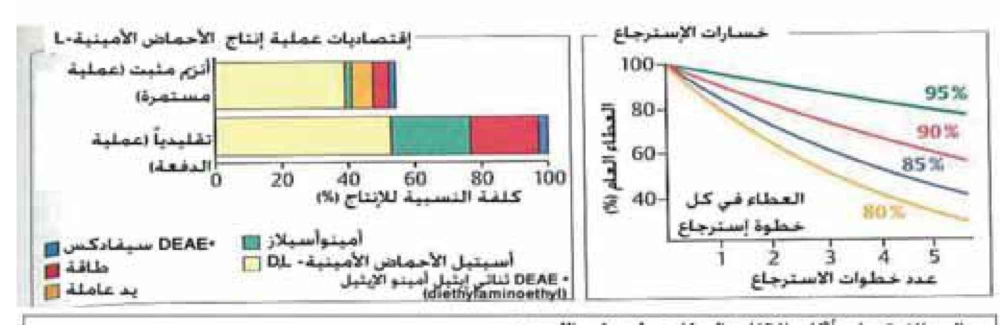
عمليات بسيطة ومتينة (Simple and robust processes). أثناء العمليات ذات المراحل المتعددة، التي هي اعتيادية في التقانة الحيوية، يمكن لحذف خطوة واحدة فقط في العملية أن يقدم مزايا هامة وملموسة. من هنا أصبح ما يعرف باسم مِصفق ويستفاليا (Westphalia decanter) كثير الاستخدام في إنتاج مضادات الحيوية لأنه يجمع المرحلتين: فصل الخلايا والاستخلاص بالمذيب. كما أنه من الضروري أن تكون العمليات متينة لأن عمليات التقانة الحيوية تستغرق وقتاً طويلاً وتُنفذ غالباً من قبل عاملين غير مهرة في مناوبات العمل؛ إذ يشكل تلوث المفاعل الحيوي أثناء دورة عمله مشكلة كبيرة ودائمة، يمكن أن تؤدي إلى خسارات بمئات آلاف اليورو أو الدولارات.

عدد العاملين القليل وتكاليف رأس المال المنخفضة (Low personnel and capital cost). بين 10٪ و40٪ من تكاليف الإنتاج في التقانة الحيوية هي مخصصة لليد العاملة. وتستغرق دورة عادية من دورات عمل المخمر مع عملية استرجاع المنتج حوالى أسبوع، مع وجوب مراقبة العملية من قبل العاملين في مناوبات على مدار الساعة. كما أن الاستثمار برأس المال لمنشأة إنتاج تعتمد على المفاعل الحيوي هو بحدود 10^7 ـ 10^8 وذلك تبعاً للمنتج. أما بالنسبة إلى تراجع قيمة المنشأة وتكاليف التأمين فيمكن أن تصل إلى 10٪ أو أكثر من تكاليف التصنيع.

المواد الأولية وموازنة الطاقة (Energy balance and raw materiels). تحدد تكاليف الطاقة بشكل رئيسي بتكاليف التعقيم والتبريد والتحريك. إذ تعقَم المفاعلات الحيوية الكبيرة المستخدمة في العمليات الصناعية على نحوٍ مستمر أو بحقن البخار (140ºC لمدة 4 دقائق). كما يتبدد حوالى نصف طاقة المصدر الكربوني كحرارة أثناء نمو الخلايا. لذلك، وفي مخمرات الإنتاج، يستخدم غلاف التبريد (cooling jackets) وأنابيب التبريد الحلزونية لإزالة هذه الحرارة. إلا أنه مع مبادلات التسخين، يتم استرجاع 90٪ تقريباً من الطاقة المستخدمة في التعقيم وتلك الناتجة من التبريد. أما في عمليات التخمير التقليدية مثل إنتاج حمض الليمون (citric acid)، فيمكن للمواد الأولية، خاصة المصدر الكربوني، أن تكون مسؤولة عن 30 إلى 60٪ من كلفة التصنيع الإجمالية؛ إذ يمكن لتركيب المواد المغذية المعقدة والرخيصة التي تستخدم في معظم الأحيان أن يختلف من دفعة إلى أخرى. لذا تعتبر مقايسة ورقابة نوعية المواد الأولية من المتطلبات الهامة في التصنيع.

التخلص من الكتلة الخلوية ومعالجة مياه الفضلات (Cell mass disposal and waste water treatement). تتجمع بعد عمليات التخمير، كتلة الخلايا والأوساط المغذية المستخدمة بأحجام كبيرة؛ مع قيم BOD_5 مرتفعة جداً تحول دون رميها مباشرة. فعلى سبيل المثال، يؤدي إنتاج حمض الليمون (citric acid) في مفاعل حيوي بحجم $300m^3$ إلى تشكل 15 طن كتلة خلوية رطبة من الخيوط الفطرية المتشابكة ـ الميسيليوم ـ (mycelium) للفطر *Aspergillus niger* بعد الترشيح على شكل عجينة. ولأسباب بيئية، يتم حرق هذه البقايا ـ وهي عملية مكلفة لفضلات ذات محتوى مائي مرتفع. ثم في نهاية عملية التخمير، يتواجد المنتج المرغوب منحلاً في محلول مائي بشكل مخفف (diluted) جداً؛ حيث إنه حتى في البروتوكولات المؤمثلة بشكل جيد، نادراً ما يتجاوز العطاء نسبة 10٪. كما تؤدي عملية تنقية المنتج اللاحقة إلى كميات من الفضلات الغنية بالمواد المغذية التي يمكن أن تحوي أملاحاً أو مذيبات عضوية؛ وبذلك تتطلب معالجتها في محطات الصرف نفقات إضافية يجب إدخالها في حسابات التكاليف.

تحليل الحساسية (Sensitivity analysis). من الممكن تقسيم كل عملية حيوية (bioprocess) إلى وحدات تشغيل منفردة تخضع لتدقيق اقتصادي. هذا الإجراء يساعد في تحديد أي خطوة من خطوات العملية هي المكلفة بشكل كبير، وأين يمكن لإجراءات التحسين أن تؤدي لتوفير أكبر. في معظم الأحيان تستخدم لهذه التحليلات برامج حسابات جدولية، حيث إنها تسهل رؤية تأثير العوامل الفردية بطريقة شبكية. وعليه، تبين كلفة المواد المستخدمة في إنتاج الإنسولين (insulin) البشري المأشوب (recombinant) (المعروضة في الصفحة المقابلة) فوراً أن سعر المواد الكيميائية المستخدمة في الاسترجاع تتجاوز سعرٍ مواد التخمير الأولية بحوالى 10 مرات، حيث يمثل كلٌ من الغوانيدين هيدروكلورايد (guanidine HCL) (لفك التفاف (unfolding) الأجسام الضمنية (inclusion bodies)) والكاربوكسي بيبتيداز B (carboxypeptidase B) (المستخدم لقطع البروتين المندمج (fusion protein)) عاملين أساسيين في الكلفة. وبالنتيجة، سوف تركز الأمثلة الاقتصادية لعملية إنتاج الإنسولين على بروتوكولات تكون فيها هذه الكواشف غير لازمة.



جوانب الاسترجاع أثناء الإنتاج الصناعي لحمض الليمون

محلول التغذية	خطوة العمل	المنتج المعزول أو الفضلات
	محلول المخمر، 284000L	
ماء غسل	خزان ترسيب	كتلة حيوية رطبة، وزن جاف 3400kg
	مرشح	
~22000kg كلس $[Ca(OH)_2]$	خزان ترسيب، فاصل	سيترات الكالسيوم
	تسخين للدرجة 80-90°C، ثم 95°C	
	مرشح دوار، 40000L معلق سيترات الكالسيوم في عجينة الترشيح	فضلات (رشاحة)
~35000kg حمض كبريت 95 %، شرابات كحولية أم	خزان حمض	
ماء غسل	مرشح	~6000kg سلفات الكالسيوم
	مبخر : 67% حمض ليمون في البقايا	
	مبادل أيونات، فحم منشط	
	مبلور	
ماء غسل	طارد مركزي	شرابات كحولية أم
هواء ساخن	مجفف	
	تعليب	40456kg حمض ليمون، مزيل مائي

تكاليف مواد إنتاج البروتين المأشوب

(إنسولين بشري في الـ E.coli، عملية هوكست (Hoechst) القديمة، مخمر $35m^3$، دفعة مغذاة، 24 ساعة، 25g/L كتلة خلايا جافة، إنتاجية 1 طن/السنة)

نوع الكلفة	الكمية (kg في السنة)	السعر (دولار أمريكي/kg)	القيمة (دولار أمريكي/kg/السنة)	الكلفة المحددة (%)
غلوكوز	432640	0.69	298520	68.3
شراب الذرة الكحولي الحاد	652800	0.12	78336	17.9
أملاح	~12000		~40000	8.4
عامل مضاد رغوة	2448	4.86	11897	2.7
تيتراسيكلين	163.2	55	8965	2.7
مواد التخمير الأولية			437000	100 % نسبياً
غوانيدين هيدروكلورايد (guanidine HCL) (للأجسام الضمنية غير المنثنية)	1007	2.15	2165100	56.4
الكاربوكسي بيبتيداز B (carboxypeptidase B) (لشق البروتين المندمج)	0.8	1023.00/g	818400	21.3
حمض النمل (فورميك)	262280	1.25	327850	8.5
بروموسيان (bromcyan)	22848	11.00	251330	6.5
كافة المواد الكيميائية الأخرى			28000	7.3
المواد المسترجعة			3839000	100 % نسبياً

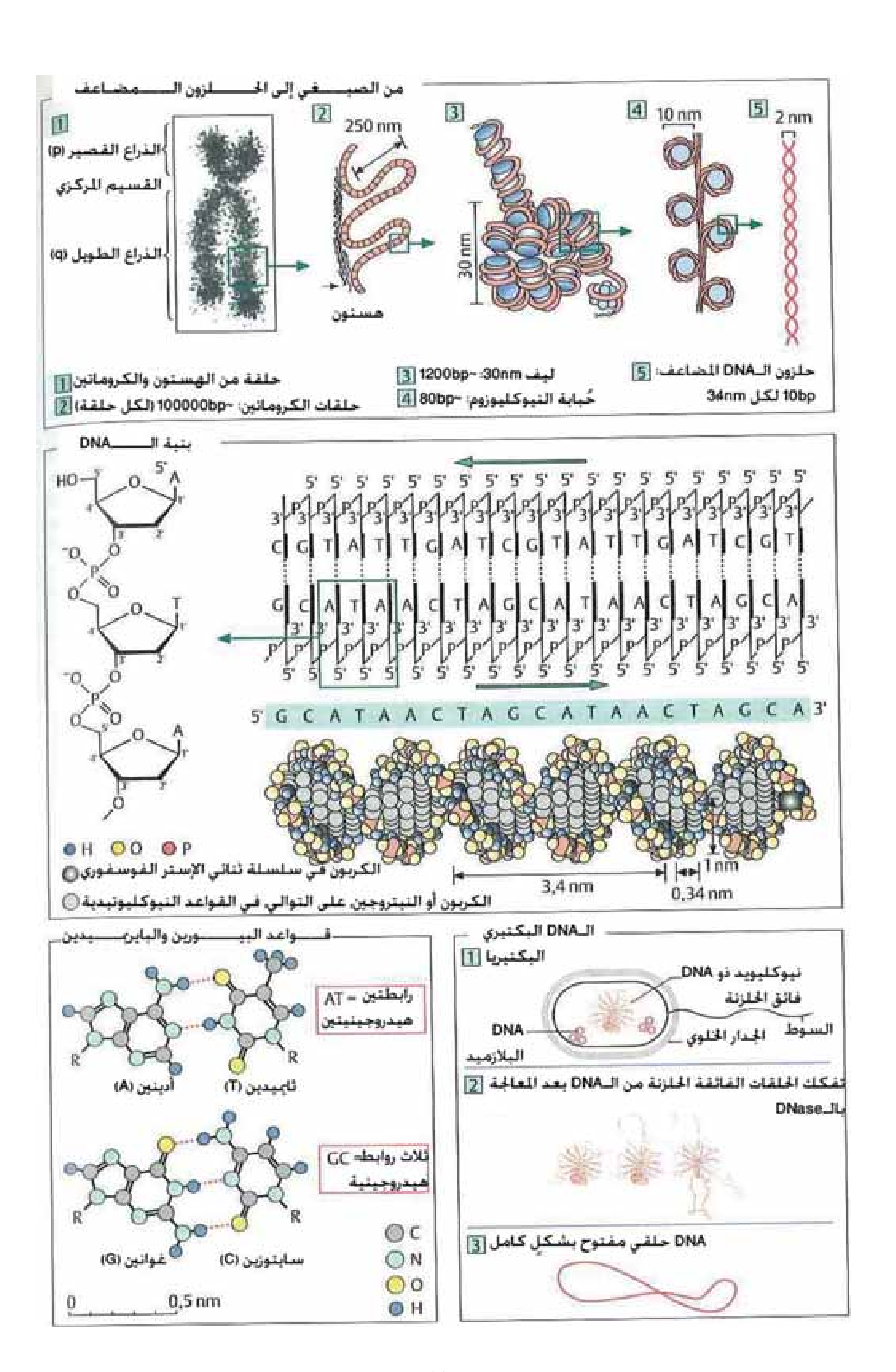
■ مبادئ الوراثة الجزيئية

● الـ DNA: البنية (DNA structure)

عموميات (General). أثناء انقسام الخلية، تنتقل المعلومات الوراثية من الخلية الأم إلى الخلية البنت (في أوليات النوى (prokaryotes): أثناء انقسام الخلية؛ في حقيقيات النوى (eukaryotes): بعد اندماج خليتين أبويتين أحاديتي الصيغة الصبغية (haploid)). ويدعى المركب الكيميائي الحامل لهذه المعلومات بالحمض النووي الريبي منقوص الأكسجين (deoxyribonucleic acid) (DNA)، وهو مركب جزيئي فائق (suprmolecular) على شكل حلزون مضاعف (double helix) ذي كتلة مولية (molar mass) تصل حتى 10^9Da، مكون من جزيئين منفردين. تخزن معظم الكائنات الحية معلوماتها الوراثية في جزيئات الـ DNA، مما يجعل انتقاله المختلف الأصل (heterologous transfer) ضمن أنواع مختلفة وغير مترابطة من الكائنات أمراً ممكناً من حيث المبدأ، على الرغم من ندرته، مثلاً، أثناء العدوى الفيروسية. منذ أوائل السبعينيات، تم تطوير طرائق تقنية تسمح بنقل المعلومات الوراثية بين كائنات حية مختلفة (الهندسة الوراثية). وبذلك، أحدثت هذه التقنيات ثورة في علم الأحياء الخلوية (cell biology) وتطورات هامة في التقانة الحيوية.

البنية الكيميائية للـ DNA، (Chemical structure of DNA). تدعى وحدة بناء الـ DNA بالنيكليوتيد (nucleotide)، حيث تتكون بنيتها من مركبين أساسيين: - deoxyribose-5´ phosphate (حمض نووي ريبي منقوص الأوكسجين مرتبط بمجموعة فوسفات عند الموقع 5´)؛ وأحد القواعد النيتروجينية الأربع؛ الأدينين (adinine (A))، الغوانين (guanine (G))، الثيامين (thymine (T))، أو السايتوزين (cytosine (C))؛ التي ترتبط كل منها غليكوزيدياً (gycisidically) بواسطة ذرة النيتروجين رقم 1 (N1) الموجودة لديها مع الموقع 1 من الجزء السكري. وفي الـ DNA، ترتبط النيوكليوتيدات مع بعضها البعض على شكل بوليمر سكري من ثنائي استر الفوسفور (phosphodiester) بجسور فوسفاتية بين ذرة الكربون 5´ من أحد النيوكليوتيدات مع ذرة الكربون بالموقع 3´ من النيوكليوتيد الثاني. تلتحم هذه البوليميرات بطريقة نوعية (متخصصة) للغاية لتشكل حلزون جزيئي فائق مضاعف (supermolecular double helix)، وذلك إذا سمح التسلسل القاعدي بتشكل الزوج AT المرتبط برابطتين هيدروجينيتين أو الزوج GC المرتبط بثلاث روابط هيدروجينية. بالنتيجة، يتشكل الحلزون المضاعف فقط لجديلتين مفردتين (single-strand) من بوليمر الـ DNA متكاملتين بتسلسل نيكليوتيداتها. ويتميز الـ DNA المعزول من الكائنات الحية بالصفات التالية: 1) كتلة مولية عالية جداً، 2) تخزين المعلومات الوراثية في تسلسلها النيوكليوتيدي الخطي (lineare sequence)، 3) بوليميرات الجديلين المفردتين هي ذات اتجاه واحد، أي تضم كلٌ منها نهاية 5´ ونهاية 3´، و4) تنفع كلتا الجديلتين كعارضة لنقل معلوماتها المتضمنة في تسلسلها إلى النسخة الأخرى ذات التسلسل النيوكليوتيدي المتمم.

بنية الـ DNA في الكائنات الحية (Structure of DNA in organisms). يدعى الـ DNA الإجمالي في الكائن الحي بالجينوم (genome)، وهو يتطلب بسب حجمه الكبير ووظيفته الهامة في تخزين وتوريث المعلومات الوراثية بنيات خلوية فرعية (subcellular structure) خاصة. في الكائنات العليا، يتوزع الـ DNA على عدة صبغيات، في حين أنه لا يرتبط عددها بحجم الجينوم. فمثلاً تحتوي خميرة الخباز (*Saccharomyces cerevisae*) على 16 صبغياً، وذبابة الفاكهة (*Drosophila melanogaster*) على 4 صبغيات، والكمية الأكبر من الـ DNA الموجودة في الإنسان موزعة على 23 صبغياً. هذه الصبغيات تقع في نواة الخلية حيث تشكل الكروماتين (chromatin)، [معقد من الـ DNA، والبروتينات القلوية (الهستونات (histones))]. يُعطى طول الـ DNA عادة بعدد الأزواج القاعدية .(bp) على سبيل المثال، يحتوي الصبغي الثالث عند الإنسان على جديلتين من الـ DNA، تضم كل منها 160 مليون قاعدة. وعلى اعتبار أن الطول المحسوب لـ 10^6x3 زوج قاعدي هو 1mm، فإن الطول الممتد لحلزون الـ DNA المضاعف لهذا الصبغي هو حوالى 5cm. يمتلك الـ DNA البشري الموزع على 23 صبغي في بويضة أو حيوان منوي أحادي الصيغة الصبغية (haploid) كتلة مندمجة تبلغ 10^9x3 زوج قاعدي، ما يوازي من حيث الكتلة المولية $M_R = 1,8 \times 10^{12}$ تقريباً وطول بحوالى .m-كما تحتوي الخلايا القياسية ثنائية الصيغة الصبغية (diploid) وعددها حوالى 10^{13} في جسمنا على مجموعة مضاعفة من46 صبغياً، يعادل طولها m2 بكل خلية. في كل انقسام خلوي، تتم مضاعفة هذه الـ 46 جديلة مضاعفة من الـ DNA ويعاد تجميعها مرة ثانية في 46 صبغياً في الخلايا البنت. أما في الكائنات أولية النوى (prokaryotes)، فيُبدي الـ DNA تجميعياً وتعبئة أبسط. فلأنها لا تمتلك نواة خلوية، يقع الـ DNA الخاص بها ضمن منطقة خلوية فرعية من السيتوبلازم تدعى بـ النيكلويد (nucleoid). كما أنه حتى المسافة الممتدة لجينوم بكتريا *E. coli*، وهو حلزون مضاعف من الـ DNA الدائري المفرد (single circular) ذي كتلة مولية تبلغ 10^9x2,4، تقدر بـ 1.5mm. إن مضاعفة هذا الجزيء الضخم لبكتريا *E. coli*، في الظروف المثالية للنمو، لا تتطلب أكثر من 20 دقيقة، وهو زمن التضاعف لهذا الكائن. وهذه العملية تتم بموثوقية عالية جداً (تبلغ نسبة الخطأ 10^{-7} للجين ذي الحجم 1000 زوج قاعدي).


من الصبغي إلى الحلزون المضاعف
الذراع القصير (p)
القسيم المركزي
الذراع الطويل (q)
250 nm
هستون
30 nm
10 nm
2 nm
حلقة من الهستون والكروماتين
حلقات الكروماتين: ~100000bp (لكل حلقة)
ليف 30nm: ~1200bp
حُبابة النيوكليوزوم: ~80bp
حلزون الـDNA المضاعف:
34nm لكل 10bp
بنية الـDNA
5'GCATAACTAGCATAACTAGCA3'
الكربون في سلسلة ثنائي الإستر الفوسفوري
الكربون أو النيتروجين على التوالي في القواعد النيوكليوتيدية
3,4 nm
1 nm
0,34 nm
قواعد البيورين والبايريميدين
AT = رابطتين هيدروجينيتين
أدينين (A)
ثايميدين (T)
GC= ثلاث روابط هيدروجينية
غوانين (G)
سايتوزين (C)
0,5 nm
الـDNA البكتيري
البكتيريا
نيوكليويد ذو DNA
فائق الحلزنة
السوط
الجدار الخلوي
DNA البلازميد
تفكك الحلقات الفائقة الحلزنة من الـDNA بعد المعالجة بالـDNase
DNA حلقي مفتوح بشكلٍ كامل

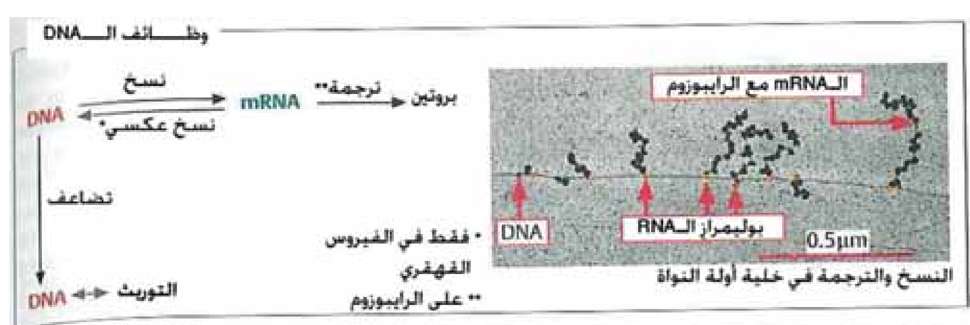
الـ DNA: الوظيفة (DNA: function)

عموميات (General). تشفر المعلومات المخزنة بالـ DNA إلى التصنيع الحيوي للبروتينات. في الكائنات الحية أولية النوى(prokaryotes)، يحدث هذا التصنيع على مرحلتين: نسخ قطعة من الـ DNA (عادة جين) إلى RNA رسول (mRNA)، وهو بوليمر من الحمض النووي الريبي (ribonucleic acid)؛ وترجمة الـ RNA الرسول إلى تسلسل بروتيني باستخدام الريبوزومات (ribosomes). أما في الكائنات الحية حقيقية النوى (eukaryots)، فهذه العملية هي أكثر تعقيداً. أولاً، تشفر أجزاء من الـ DNA فقط، وهي الإكسونات (exons)، لعملية تصنيع البروتينات. وفي الكائنات الحية العليا، قد تتجاوز تسلسلات الـ DNA غير المُشفِرة (الإنترونات (introns)) الـ DNA الإكسون بأضعاف العشرات أو أكثر من حيث الطول؛ بوقتٍ لا تزال وظيفة الإنترونات مبهمة وغير معروفة بشكل كامل حتى الآن. وبذلك، يتم نسخ الـ DNA إلى نسخة أولية (primary transcript) في نواة الخلية، ثم يُتبع بإزالة الإنترونات من هذه النسخة بواسطة عمليات القطع والوصل (Splicing)، ليغادر عندئذٍ الـ RNA الرسول المنزوع الإنترونات والناضج النواة ويرتبط بالريبوزومات الموجودة بالسيتوبلازم (cytoplasm) والشبكة الإندوبلازمية (endoplasmic reticulum). يتم تجميع السلاسل البروتينية عند هذه الريبوزومات بما يتناسب مع معلومات التسلسل المشفِر بالـ RNA الرسول. في بعض الحالات، قد يُشفر الـ RNA الرسول لتسلسلات القائدة (leader sequence)، تقوم بتوجيه البروتين إلى حيز خاص من الخلية. إضافةً إلى ذلك، يمكن تعديل خصائص البروتينات إلى حدٍ أبعد بواسطة عمليات القطع والوصل المتفاضلة (differential splicing) خلال الترجمة، أو إزالة إكسون واحد أو أكثر، أو القيام بتعديلات ما بعد الترجمة (post translational modiications) (مثلاً، إضافة الغلايكوزيل (glycosylation) أو الفسفرة (phosphorelation)). تقود مثل هذه التعديلات في الكائنات الحية العليا إلى تشكيل عدد من البروتينات يفوق تقديرياً عدد الجينات المشفِرة بحوالى 50 مرة. ففي الانسان، تشفر الجينات التي يتراوح عددها من 30000 إلى 40000 جينٍ إلى حوالى مليوني صنف من البروتينات، التي تختلف وفقاً لأنواع وعمر الخلايا. ومثل هذه التغييرات يجري تحليلها بواسطة تقنيات دراسات البروتيوم (proteomics) (التركيب البروتيني)

الشيفرة الوراثية (Genetic code). إن الشيفرة الوراثية المستخدمة بواسطة الكائنات الحية لترجمة تسلسلات الـ DNA إلى تركيبات بروتينية هي شيفرة عالمية (موحدة بين جميع الكائنات) تقريباً. في هذه الشيفرة تقود كل 3 نيوكليوتيدات من الـ DNA المُشفِر، عن طريق تسلسل الـ RNA الرسول المنسوخ، إلى إدخال حمض أميني معين داخل السلسلة الببتيدية النامية بانتقائية عالية. وبسبب كون هذه الشيفر موحدة تقريباً بين جميع الكائنات، فإنه يمكن من حيث المبدأ نقل المعلومات الوراثية من كائن حي إلى آخر. هذا النقل هو القاعدة الأساس لتقانة الهندسة الوراثية، بحيث يتم تحويل المضيف وراثياً (genetic transformation) بـ DNA غريب المنشأ. لقد تبين أن الكائن الحي المانح والكائن الحي المضيف يُبديان تفضيلات مختلفة لبعض الشفرات الثلاثية في تجارب نقل الجينات. تعود هذه المشكلة إلى حقيقة كون الشفرة الوراثية متعددة: فعدد الشفرات الوراثية الثلاثية الفريدة ($64 = 4^3$: C، وG ،T ،A) يفوق عدد الأحماض الأمينية المعروفة (20)، أي أن هناك وفرة من الشفرات الثلاثية، تصل حتى 6 شفرات ثلاثية، المشفرة إلى حمض أميني واحد (مثلاً، UUA، UUG، CUU، CUC، CUA، وCUG تشفر جميعها لليوسين (leucine)). فكما هو موضح في هذا المثال، تمثل القاعدة الثالثة من الشفرة الثلاثية القاعدة الأقل مساهمة في نوعية (تخصص) الشفرة (نظرية Wobble). إلا أن الاستخدام الفعلي لنوع الشفرة (بصيغة أدق: كمية الـ RNA الناقل (tRNA) الخاص بكل ثلاثية) يختلف بين الكائنات، مما يقود إلى مشاكل بالغة في تجارب نقل الجينات. ومع ذلك، نظراً إلى التقدم السريع في سَلسَلة الجينومات فقد أصبح استخدام الشفرات لعدد متزايد من الكائنات أمراً متاحاً.

قليلات النيوكليوتيدات المصنعة (Synthetic oligonucleotides). وهي لازمة في العديد من تجارب الهندسة الوراثية. تستخدم قليلات النيوكليوتيدات هذه كمسابر (probes) في تجارب التهجين، وكبادئات (primers) (تسلسل بادئ لازم لبوليمراز الـ DNA) في تفاعل البوليمراز التسلسلي (PCR) والتطفير الموجه في الموقع (site-direct mutagenesis) للبروتينات. إن المسبر أو البادئة المنتقيين بصورة جيدة يمكن أن يتحدان مع تسلسل نوعي للغاية من الـ DNA المعزول من الكائن الحي أو الخلية، مما يسمح بكشف (detection)، وكلونة (cloning) وتضخيم (amplification) تسلسل جين واحد. وفي حالة عدم توفر تسلسل DNA مشفِر للبروتين المراد كلونته، فإنه يمكن اشتقاق تسلسله المفترض عن طريق سلسلة البروتين المنقى. إلا أنه بسبب حقيقة أن الشفرة الوراثية هي متعددة الإشفار، فإن ذلك يستلزم تصنيع عدد من البادئات المفترضة («بادئ/ مسبر متعدد») كيميائياً من أجل تنفيذ تجارب الكلونة. فإذا قاد خليط البادئ أو المسبر إلى الالتحام أو التضخيم (باستخدام طريقة وصمة ساوثيرن (So uthern blot) أو الهجرة الكهربائية على الهلام (gel electrophoresis) بعد التضخيم)، عندها يتم عزل الـ DNA المرغوب بحيث يمكن سَلسَلته لمعرفة التسلسل النيوكليوتيدي الحقيقي له.

وظـــــائف الـــــDNA



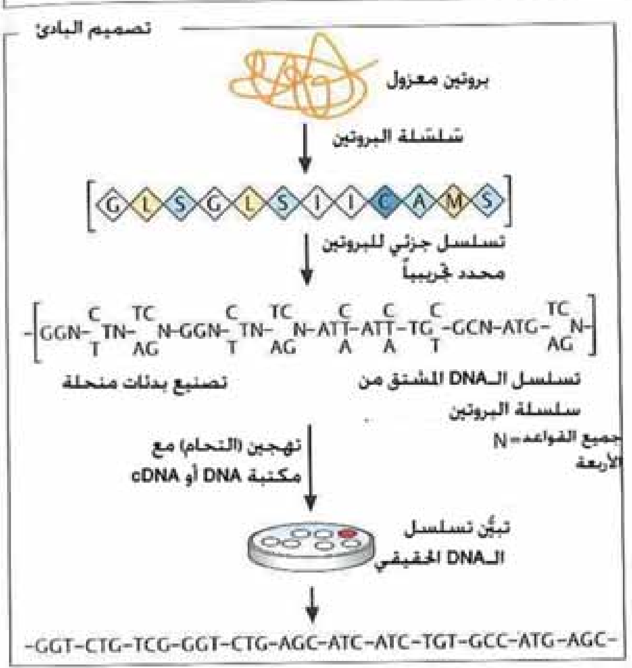
النسخ والترجمة في خلية أولية النواة

* فقط في الفيروس القهقري

** على الرايبوزوم

الإشـــــفار الـــــوراثي

الحمض الأميني	الشفرة	الحمض الأميني	الشفرة	الحمض الأميني	الشفرة	الحمض الأميني	الشفرة
phenylalanine (F) (فينيل الانين)	UUU	serine (S) (سيرين)	UCU	tyrosine (Y) (تايروزين)	UAU	cysteine (C) (سيستين)	UGU
	UUC		UCC		UAC		UGC
leucine (L) (ليوسين)	UUA		UCA	stop	UAA	stop	UGA
	UUG		UCG	stop	UAG	tryptophan (W) (تريبتوفان)	UGG
leucine (L) (ليوسين)	CUU	proline (P) (برولين)	CCU	histidine (H) (هيستيدين)	CAU	arginine (R) (أرجينين)	CGU
	CUC		CCC		CAC		CGC
	CUA		CCA	glutamine (Q) (غلوتامين)	CAA		CGA
	CUG		CCG		CAG		CGG
isoleucine (I) (أيزوليوسين)	AUU	threonine (T) (ثريونين)	ACU	asparagine (N) (أسبارجين)	AAU	serine (S) (سيرين)	AGU
	AUC		ACC		AAC		AGC
	AUA		ACA	lysine (K) (لايزين)	AAA	arginine (R) (أرجينين)	AGA
methionine (M) (ميثيونين)	AUG		ACG		AAG		AGG
valine (V) (فالين)	GUU	alanine (A) (ألانين)	GCU	aspartic acid (D) (حمض الأسبارتيك)	GAU	glycine (G) (غلايسين)	GGU
	GUC		GCC		GAC		GGC
	GUA		GCA	glutamic acid (E) (حمض الغلوتاميك)	GAA		GGA
	GUG		GCG		GAG		GGG



إستخدام الشيفرة

الحمض الأميني	الشفرة	الوتيرة (E. coli)	الوتيرة (S. cerevisiae)	الوتيرة (الإنسان)
Glu, E	CAG	0,30	0,31	0,59
	CAA	0,70	0,69	0,41
Lys, K	AAG	0,24	0,43	0,60
	AAA	0,76	0,57	0,40
Pro, P	CCG	0,55	0,12	0,11
	CCA	0,20	0,42	0,27
	CCU	0,15	0,31	0,29
	CCC	0,10	0,15	0,33

E. coli

S. cerevisiae

الإنسان

الهندسة الوراثية: الخطوات العامة

(Genetic engineering: general steps)

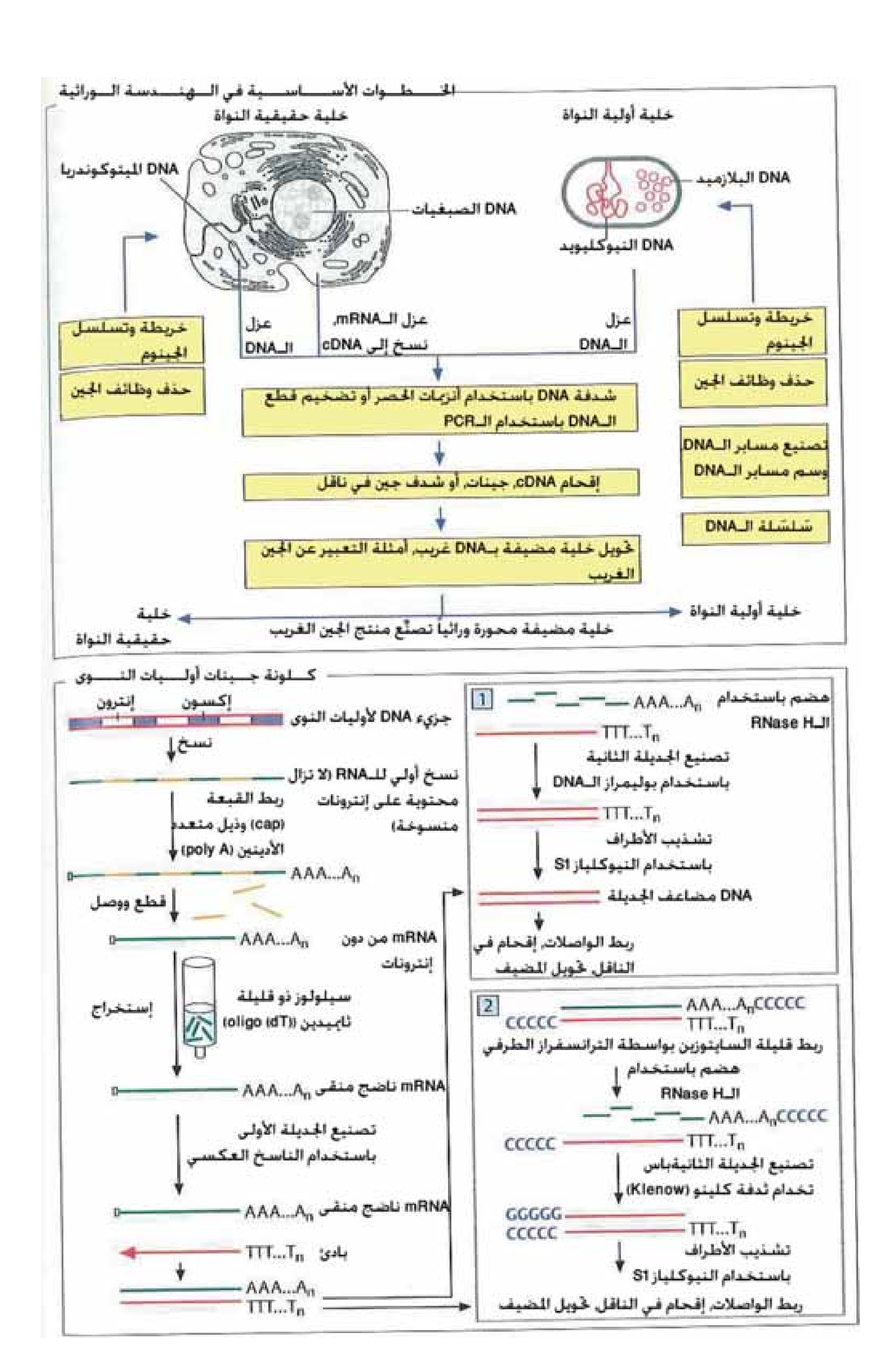
عموميات (General). على الرغم من التطبيقات العديدة والواسعة للهندسة الوراثية، إلا أنها تحتاج فقط إلى خطوات أساسية قليلة لنقل الـ DNA الغريب والتعبير عنه في الخلية المضيفة. وهذه الخطوات تضم: 1) التلاعب بالـ DNA وخصوصاً من ناحية العزل، والتضخيم، والتعديلات الأنزيمية، والتوصيف، والسَلسَلة، والتصنيع الكيميائي، و2) كلونة (cloning) الـ DNA والتعبير عنه في الخلايا أولية النوى (prokaryotes) والخلايا حقيقية النوى (eukaryotes).

التنقية، التعديل الأنزيمي، والتضخيم (Purification، enzymetic modification، and amplification). يتواجد الـ DNA في جميع الخلايا بكميات قليلة جداً (فقط جزيء واحد في الخلية الأولية النواة (prokaryotic) وفي كل صبغي في الخلية الحقيقية النواة (eukaryotic))، لكنه يبقى ممكناً عزله بصورة نقية من خلال الاستخلاص. يعتبر الـ DNA الكامل كبير جداً بالنسبة إلى الخطوات اللاحقة من الهندسة الوراثية، لذلك ولحسن الحظ تم العثور على أنزيمات تقوم بقص، تعديل، لصق، وتضخم الـ DNA انتقائياً. بالإضافة إلى أنزيمات تساعد على ترجمة تسلسلات الـ DNA إلى RNA رسول (mRNA) داخل أنبوب الاختبار (في الزجاج (in vitro). كما يمكن تصنيع شدف أقصر من الـ DNA (أصغر من bp) كيميائياً باستخدام جهاز روبوتي. إلا أنه، في معظم المهمات تكون كمية الـ DNA المعزولة من الخلية غير كافية. لذلك من الضروري تضخيم قطع الـ DNA ذات حجم يصل حتى bp1000 بواسطة تفاعل البوليمراز التسلسلي (PCR)؛ ما يسمح، على سبيل المثال، بتأشيب شدف الـ DNA ذات المنشأ المختلف (مثلاً، من كائنات مختلفة أو من التصنيع الكيميائي).

التوصيف والسلسلة (Characterization and sequencing). يمكن توصيف شدف الـ DNA بناءً على: 1) أسلوب انصهارها (ينصهر حلزون المضاعف من الـ DNA الذي يحتوي على عدد كبير من الأزواج GC القاعدية المرتبطة بثلاث روابط هيدروجينية على درجة حرارة أعلى من ذلك الذي يحتوي على أزواج AT القاعدية المرتبطة برابطتين هيدروجينيتن)، 2) كتلتها المولية، التي يتم تحديدها عادة بواسطة الهجرة الكهربائية على الهلام (gel electrophoresis)، 3) تسلسلها النيوكليوتيدي، 4) التوصيف البيولوجي لعناصرها الوظيفية، 5) وضع خريطة للتسلسلات التي يمكن قطعها أنزيمياً بأنزيمات حصر متنوعة لكنها انتقائية.

الكلونة (Cloning). يمكن كلونة تسلسل من الـ DNA، وهو عادة ما يكون جيناً يُشفِر لبروتين معين، مأخوذ من جينوم كائن حي أولي النواة (prokaryotic) بصورة مباشرة. لكنه عند كلونة جين وظيفي مأخوذ من خلية حقيقية النواة (eukaryotic)، فإنه يجب أولاً إزالة الإنترونات (introns) منه. غالباً ما يتم التغلب على هذه المسألة عن طريق البدء بالـ RNA الرسول (mRNA) الناضج، أي الـ mRNA بعد إخضاعه لعملية القطع والوصل (splicing)، ومن ثم النسخ في الزجاج إلى DNA متمم (cDNA) مضاعف الجديلة باستخدام أنزيم النسخ العكسي ((reverse transcriptase (RT))، الذي يتم عزله غالباً من الفيروسات القهقرية (retroviruses) التي تصيب الثدييات. كما يمكن في هذا التفاعل أيضاً استخدام أنزيم بوليمراز الـ (DNA (DNA-polymerae الثابت حرارياً والمأخوذ من بكتريا *Thermus thermophilus*. فهو يمكنه أن يعمل، بوجود أيونات المنغنيز (Mn^{+2})، بشكل مشابه لأنزيم النسخ العكسي وبذلك يقبل الـ RNA، وكذلك الـ DNA كعارضة (template) لمضاعفة الحمض النووي. بالنتيجة، يتم تحويل هجين الـ DNA-mRNA في هذا التفاعل إلى جديلة مفردة من الـ DNA باستخدام الـ RNase، وبالتالي الحصول على عارضة تنفع بأن تستخدم في تفاعل البوليمراز التسلسلي لتوليد DNA مضاعف الجديلة. إضافةً إلى ذلك، يمكن استغلال ميزة أخرى من ميزات الـ mRNA المعزول من خلية حقيقية النواة إذا كان من المراد تضخيمه بطريقة غير نوعية: فلأن جميع جزئيات الـ mRNA لحقيقيات النوى تحمل تسلسلات من متعدد الأدنين (polyA) على النهاية ´3، فإنه يمكن استخدام السلسلة النيوكليوتايدية المتمِّمة، وهي متعدد الثيامين (polyT) كبادئ (primer) في عملية التصنيع الأنزيمي لهجين الـ DNA-mRNA.

التعبير (Expression). تتوفر العديد من الطرائق المشروحة لاحقاً لكلونة (cloning) ومضاعفة (replicating) والتعبير (expression) (نسخ (transcribing) وترجمة (translation)) عن الـ DNA الغريب أو الـ DNA المتمم (cDNA) في الخلية المضيفة. هذه الخلايا المضيفة من المفضل أن تكون أنواعاً بكتيرية للأسباب التالية: 1) كون جينومها يتألف من حلزون DNA مضاعف مفرد (single DNA double helix)، 2) دراسة مركبها الوراثي الجزيئي بشكل مستفيض، 3) توفر البلازميدات (plasmids) والعاثيات (phages) التي يمكن أن تستخدم كنواقل (vectors)، 4) تكاثرها السريع وإمكانية تربيتها وتأصيلها (bred) بكميات كبيرة في المفاعل الحيوي. من بين الأنواع البكتيرية المتوفرة للكلونة والتعبير عن الـ DNA الغريب، تعتبر السلالات المعدلة من بكتيريا *E. coli* مثل السلالة *E. coli K12* المفضلة. لكنه جرى أيضاً استخدام أنواع بكتيرية أخرى مثل *Bacillus subtilis* وLactobacillus وعدة أنواع من بكتريا Pseudomonas وسلالات Streptomyces بنجاح. إضافةً إلى إمكانية تحويل (transform) الكائنات الحية الأعلى كالفطور والخمائر وخلايا الثدييات أو الحشرات، والنباتات والحيوانات الكاملة بنقل الـ DNA الغريب إليها.


الخطوات الأساسية في الهندسة الوراثية
خلية حقيقية النواة
خلية أولية النواة
DNA الميتوكوندريا
DNA الصبغيات
DNA البلازميد
DNA النيوكليويد
خريطة وتسلسل الجينوم
حذف وظائف الجين
عزل الـDNA
عزل الـmRNA، نسخ إلى cDNA
عزل الـDNA
خريطة وتسلسل الجينوم
حذف وظائف الجين
شدفة DNA باستخدام أنزيمات الحصر أو تضخيم قطع الـDNA باستخدام الـPCR
تصنيع مسابر الـDNA
وسم مسابر الـDNA
إقحام cDNA، جينات، أو شدف جين في ناقل
سلسلة الـDNA
تحويل خلية مضيفة بـDNA غريب، أمثلة التعبير عن الجين الغريب
خلية حقيقية النواة
خلية أولية النواة
خلية مضيفة محورة وراثيا تصنّع منتج الجين الغريب
كلونة جينات أوليات النوى
إنترون
إكسون
جزيء DNA لأوليات النوى
نسخ
نسخ أولي للـRNA (لا تزال محتوية على إنترونات منسوخة)
ربط القبعة (cap) وذيل متعدد الأدينين (poly A)
AAA...An
قطع ووصل
AAA...An
mRNA من دون إنترونات
إستخراج
سيلولوز ذو قليلة ثايميدين (oligo (dT))
AAA...An
mRNA ناضج منقى
تصنيع الجديلة الأولى باستخدام الناسخ العكسي
AAA...An
mRNA ناضج منقى
TTT...Tn
بادئ
AAA...An
TTT...Tn
1
AAA...An
هضم باستخدام الـRNase H
TTT...Tn
تصنيع الجديلة الثانية باستخدام بوليمراز الـDNA
TTT...Tn
تشذيب الأطراف باستخدام النيوكلياز S1
DNA مضاعف الجديلة
ربط الواصلات، إقحام في الناقل تحويل المضيف
2
AAA...AnCCCCC
CCCCC
TTT...Tn
ربط قليلة السايتوزين بواسطة الترانسفراز الطرفي
هضم باستخدام الـRNase H
AAA...AnCCCCC
CCCCC
TTT...Tn
تصنيع الجديلة الثانيةباستخدام ثدفة كلينو (Klenow)
GGGGG
CCCCC
TTT...Tn
تشذيب الأطراف باستخدام النيوكلياز S1
ربط الواصلات، إقحام في الناقل تحويل المضيف

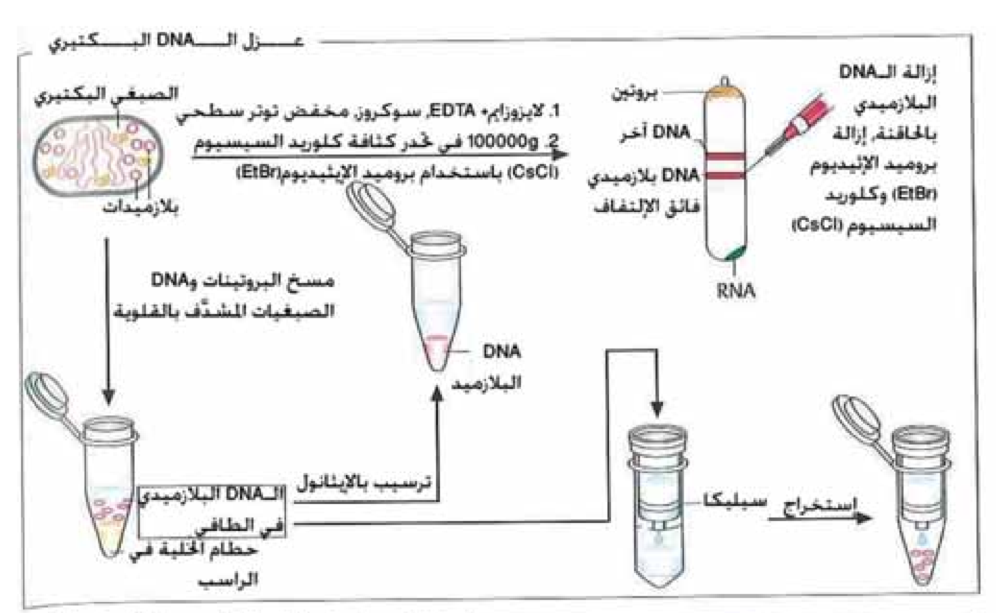
• تحضير الـ DNA (Preparation of DNA)

عموميات (General). عادةً ما يشكل تحضير وتعديل وتوصيف الـ DNA من الخلايا الحية الخطوة الأولى في الهندسة الوراثية. إن الأداة الأساسية في مثل هذه التجارب تتمثل بأنزيمات الاقتطاع النووية الداخلية الحصرية (restriction endonucleases)، التي تُستَخدم أيضاً في بناء الخرائط الفيزيائية للجينات.

تحضير الـ DNA. يمكن أن يتواجد الـ DNA بأشكال مختلفة اعتماداً على الكائن الحي أو نوع الخلية. وعليه، فإن عزله يستلزم استخدام بروتوكولات متنوعة. يتميز DNA أوليات النوى (prokaryotes) بأنه غير متَضَمَّن في نواة خلوية. لذلك، يمكن عزله بعد؛ تحليل جدار الخلية أنزيمياً باستخدام خليط من أنزيم الليزوزيم (lysozyme) ومنظف (عادةً الـ (Sodium Dodecyl Sulfate) (SDS))، وتمسيخ (denaturateion) بروتينات الخلية بواسطة خليط من مذيبات الفينول (phenol) والكلوروفورم (chloroform). ثم عند إخضاع هذا المزيج للطرد المركزي يمكن ترسيب الـ DNA من الطور الطافي بإضافة الإيثانول (ethanol) البارد. كثيراً ماتحتوي البكتريا إلى جانب جزيء الـ DNA الجينومي المفرد على DNA بلازميدي (plasmid) ذي كتلة جزيئية أقل بكثير، وهو يلعب دوراً هاماً في التجارب الوراثية. ومن أجل عزله، يمكن اتباع التحلل الخلوي بإضافة هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) ومنظف لترسيب البروتينات وجعل الـ DNA الصبغي محللاً جزيئياً. بعد ذلك، ولدى استخدام الشروط المناسبة، يبقى الـ DNA البلازميدي على شكل جديلة مضاعفة دائرية (circular double-strandedDNA) يمكن فصلها من الطور الطافي الناتج من الطرد المركزي بواسطة الطرد المركزي المستخدَم فيه مزيج متحدر الكثافة (density gradient) (سكروز (sucrose) أو السيزيوم كلورايد، ((CsCl)، في النهاية يتم عزل هذا الـ DNA البلازميدي من خلال الترسيب بالإيثانول أو بشكل أبسط باستخدام أعمدة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني (ion-exchange chromatography). يسمى هذا الإجراء الأخير، اعتماداً على كمية الـ DNA المعزول، بالتحضير الأدنى (mini-prep) (حوالى 20μg DNA أو بالتحضير الأقصى (maxi-prep) (عدة ميلليغرامات من الـ DNA). من جهةٍ أخرى، يستخلص DNA العاثية (phage) من مزارع بكتيرية مصابة بعزل البكتريا المحللة بواسطة الطرد المركزي، وترسيب جزئيات العاثية بواسطة البولي إيثلين غلايكول (PEG)، ثم التخلص من القفيصة (capsid) بواسطة الاستخلاص بالفينول، وفي النهاية ترسيب DNA العاثية من الطور الطافي بواسطة الإيثانول. أما الـ DNA في حقيقيات النوى الذي يتوزع على عدد من الصبغيات الموجودة ضمن نواة الخلية، فيستخلص كاملاً من الخلايا الحيوانية بتحليل الخلايا بمنظف، وهضم البروتينات والـ RNA بواسطة أنزيم البروتيناز K، (Proteinase k) وأنزيم الـ RNase، ثم إزالة المنظف والبروتينات بالترسيب الملحي (salt precipitatin)، وفي الختام ترسيب الـ DNA من الطور الطافي بواسطة الإيثانول. وبالنسبة إلى الـ RNA الرسول الذي خضع لعمليات القطع والوصل، والذي يُستخدم كمصدر للمعلومات الوراثية في العديد من التجارب الوراثية على حقيقيات النوى (eukaryotes)؛ فإن عزله يتم من الأعضاء أو الزرعات الخلوية بتحليل الخلايا أولاً، ثم إزالة نواة الخلية بالطرد المركزي، ثم إزالة البروتينات بالاستخلاص بالفينول، وفي النهاية القيام بترسيبه من الطور الطافي. ومن ضمن أنواع الـ DNA، هناك أيضاً DNA الميتوكندريا والصانعة ـ البلاستيد ـ (plastid) في الكائنات الحية حقيقة النواة القادرة على التمثيل الضوئي (photosynthesis). فهو يتضاعف بشكل مستقل عن الـ DNA الصبغي، حيث يمكن عزله من هذه العضيات بإجراءات مشابهة بعد فصله بالطرد المركزي المتفاضل.

أنزيمات الحصر : (أنزيمات الاندونيوكلياز الحصرية)
Restriction enzymes (restriction endonucleases). وهي تُصنَّع من قبل البكتريا بهدف الحماية من الـ DNA الغريب (DNA) العاثية (phage) الذي يمكن أن يدخل إليها. تستخدم هذه الأنزيمات بشكل واسع في الهندسة الوراثية لقطع جدائل الـ DNA الطبيعية الطويلة بشكلٍ انتقائي إلى شدف أصغر محددة بصورة جيدة. فهي ترتبط بتسلسلات التمييز ـ تتعرف عليها ـ في الـ (recognition sequence) ذات طول يتراوح بين 4ـ 10 نيوكليوتيدات، ثم تقوم بتحليل جديلة الـ DNA المضاعفة (DNA double strand hydrolysis) داخل أو قرب موقع التمييز مخلفة نهايات غير ناتئة (blunt) أو نهايات مفردة الجديلة جزئياً أي نهايات ناتئة (sticky) أو ملتصقة (cohesive). وإننا نحصل لدى قطع الجزيء المنقى من الـ DNA بواسطة أنواع مختلفة من أنزيمات الحصر والقيام بتسجيل حجم الشدف الناتجه من كل تجربة باستخدام الهجرة الكهربائية على الهلام (gel electrophoresis) أو سَلسَلة الـ DNA، على خريطة حصر (restriction map) لهذا الـ DNA؛ التي يمكن أن تستخدم كقاعدة إستراتيجية لإقحام DNA (insert) غريب والتعبير عنه. كما يمكن إحصائياً حساب تردد أماكن القطع لأنزيم الحصر من خلال طول موقع التمييز الخاص به، وبذلك فإن أي أنزيم له موقع تمييز مؤلف من 4 أزواج قاعدية (مثل، أنزيم *Alu I*، (AGCT سيقطع عند $(1/4)^4 = (1/256)$ أو سيقطع مرة كل 256 زوجاً قاعدياً. إلا أن توزع معلومات التسلسلات من الـ DNA ليس عشوائياً، وبالتالي فإن تردد القِطْع الملحوظ يختلف عن هذا الحساب. كما يعتمد التعرف على موقع القطع التمييز ـ على محتوى الـ DNA من الغوانين والسايتوزين ـ (G+C) وهو ما يمكن استخدامه في توصيف الكائن الحي.

عـــزل الـــDNA البـــكتيري



أنزيمات الحصر (أنزيمات الإقتطاع النـــووية الـــداخلية)

الأنزيم	الكائن	تسلسل التمييز ('5--->'3)	النهاية- '3
Not I	*Nocardia otitidis-caviarum*	GCGGCCGC	ناتئة
Eco RI	*Escherichia coli*	GAATTC	ناتئة
Bam HI	*Bacillus amyloliquefaciens*	GGATCC	ناتئة
Bgl II	*Bacillus globigii*	AGATCT	ناتئة
Pvu I	*Proteus vulgaris*	CGATCG	ناتئة
Pvu II	*Proteus vulgaris*	CAGCTG	غير ناتئة
Hind III	*Haemophilus influenzae* R_d	AAGCTT	ناتئة
Hinf I	*Haemophilus influenzae* R_f	GANTC	ناتئة
Sau 3A	*Staphylococcus aureus*	GATC	ناتئة
Alu I	*Arthrobacter luteus*	AGCT	غير ناتئة
Taq I	*Thermus aquaticus*	TCGA	ناتئة

معـــقـد الـــDNA لأنـــزيم الحـــصر

أنزيم الإقتطاع النووي الداخلي Eco RI يتبيان (1 rva) 0.20nm

وتـــيرة القـــطع

قطع الـDNA-λ بواسطة	عدد مواقع القطع المحسوبة	الموجودة
Bgl II	12	6
Bam HI	12	5
Sal I	12	2

تميّز أنزيمات الحصر الثلاث تسلسلات مؤلفة من 6 أزواج قاعدية، ما يقود إلى تواتر موقع القطع إحصائياً بما يعادل مرة كل 4096 زوج قاعدي، ما يشير إلى وجود 12 موقع قطع في الـ49000bp تقريباً للعاثية λ . إلا أن مواقع القطع الملاحظة تجريبياً هي أقل بكثير وذلك لأن التسلسلات المطلوبة للتحليل (hydrolysis) غير موزعة عشوائياً على طول جينوم العاثية

• أنزيمات أخرى مفيدة في التلاعب بالـ DNA،
(Other useful enzymes for DNA manipulation)

عموميات (General). لقد وجدت الأنزيمات التالية استخداماً واسعاً في مجال التلاعب بالـ DNA في الزجاج: 1) أنزيمات التحليل ـ الهيدرولاز ـ، التي تقطع الـ DNA عند تسلسلات محددة، 2) أنزيمات اللاياز، التي تربط شدف الـ DNA ببعضها البعض، 3) أنزيمات التنشؤ ـ السينثاتاز ـ، التي تبلمر الـ DNA المضاعف الجديلة بالاعتماد على عارضة الـ DNA المفردة الجديلة، 4) أنزيمات التحليل والترانسفيرز، التي تستخدم في تعديل الـ DNA عند النهايتين ´3 و´5، و5) الأنزيمات المصاوِغة المكانية ـ التوبوزوميراز ـ، التي تسبب أو تزيل الالتفاف الفائق للـ DNA.

أنزيمات التحليل (Hydrolases). تعتبر أنزيمات الاقتطاع النووي الداخلية التي تمت مناقشتها أعلاه أهم أنزيمات التحليل. يتوفر تجارياً العديد من هذه الأنزيمات، وهي تتباين بالتسلسلات التي يمكن أن تتعرف عليها أو بقدرتها على تكوين نهايات غير ناتئة أو ناتئة (أي، نهايات مفردة الجديلة تمتد لعدة نيكليوتيدات). كما يعتبر أنزيم الاقتطاع النووي (nuclease S1) S1 المستخلص من فطر *Aspergillus niger* أنزيماً آخر من أنزيمات التحليل المستخدمة كثيراً: فهو يقطع الـ DNA مفرد ومضاعف الجديلة عند الفراغات مفردة الجديلة.

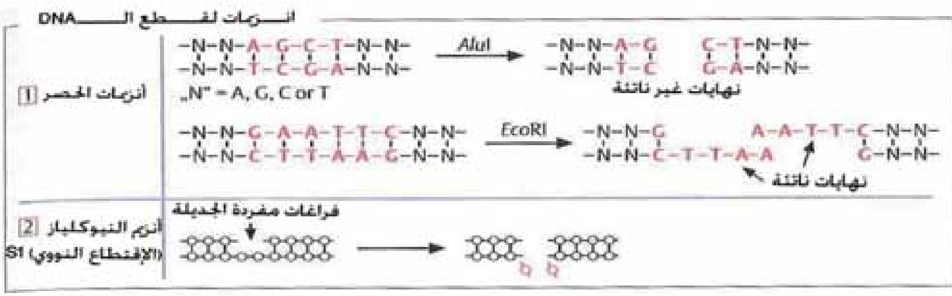
أنزيمات اللاياز والترانسفيراز (lyases, transferases). يعتبر أنزيم ربط الـ DNA، (DNA ligase) من أهم أنزيمات هذه المجموعة. فهو يعمل في الخلية كأنزيم إصلاح: يُصلح الفراغات التي قد تحدث على الـ DNA مضاعف الجديلة أثناء عمليات التضاعف، التأشيب أو الحوادث النازلة. كما يستخدم هذا الأنزيم الهام والموجود في جميع الخلايا، في الهندسة الوراثية لإعادة دمج شدف الـ DNA في الزجاج (مثلاً، لإقحام قطعة DNA غريب في ناقل). إذ يقوم بربط كل من النهايات غير الناتئة والناتئة، إلا أن النهايات غير الناتئة تُحوَّل عادة إلى ناتئة قبل إجراء الربط، لأن ربط الأخيرة أكثر فعالية (لأن التسلسل مفرد الجديلة يسهل الالتحام مع التسلسل المتمم المراد ربطه). يجري هذا التحويل للنهايات باستخدام روابط أو وصيلات أو من خلال إضافة ذيول بوليمرية (تذيُّل) لدى وجود أنزيم ترانسفيراز الديأوكسينيوكليوتديل الطرفي. يمكن إيجاد تفاصيل عن الإجراءات الخاصة بهذه العملية في الكتب ذات العلاقة. في النهاية، يتم عزل أنزيم ربط - ليغاز ـ الـ DNA عادة من خلايا بكتريا *E. coli* المصابة بالفيروس العاثي T4، (bacteriophage T4) (بالتالي يدعى (T4 DNA ligase)، بينما يتم عزل أنزيم الترانسفراز الطرفي من كبد العجل.

أنزيمات التنشؤ ـ السينثاتاز ـ (Synthetases). يعتبر أنزيم بوليميراز الـ DNA I وأنزيم النسخ العكسي من أهم أنزيمات هذه المجموعة. يتم الحصول على أنزيم بوليميراز الـ DNA I من بكتريا *E. coli*. وبوجود البادئ ذي الجديلة المفردة من الـ DNA، يرتبط هذا الأنزيم، عند وجوده داخل البكتيريا *E.coli*، وحتى أيضاً في أنبوب الاختبار، بجديلة الـ DNA المنفرد ليقوم بتصنيع الجديلة الثانية بالاتجاه ´3 ´5. إضافة إلى فعاليته في البلمرة، يُظهر أنزيم بوليمراز الـ DNA هذا قدرة على الاقتطاع النووي الخارجي بالاتجاهين ´3 ´5 و´3 ´5. كما يستطيع أيضاً أن يتعرف على الاستطالات القصيرة من الـ DNA المفرد الجديلة (الفراغات) في جزيء الـ DNA مضاعف الجديلة بطريقة أخرى ويستخدمهم كعارضات في البلمرة. تؤدي إزالة الأحماض الأمينية الـ323 الأوائل من هذا الأنزيم إلى فقدان فعاليته الاقتطاعية بالاتجاه ´3 ´5، لكن هذا الأنزيم الناتج شدفة كلينو (Klenow) يبقى يمتلك القدرة على البلمرة والاقتطاع بالاتجاه ´5 ´3، كما يستطيع ملء الفراغات مفردة الجديلة في جزيء DNA مضاعف الجديلة بطريقة أخرى. غالباً ما تستخدم شدفة كلينو لإدخال الواسمات المشعة ضمن الـ DNA، وهي تقنية مفيدة لرؤية آثار الـ DNA بالتصوير الشعاعي الذاتي (بالتعريض لفيلم الأشعة السينية). ففي تجارب الوسم، يفضل استخدام نهايات ´5 الناتئة من شدف الـ DNA كعارضة، وإتمامها بنيوكليوتيدات موسمة بالفسفور المشع ^{32}P بوجود شدفة كليناو وكذلك أيضاً، تُستخدم كثيراً أنزيمات بوليمراز الـ DNA المأخوذة من الكائنات المجهرية المحبة للحرارة بشكل واسع في تفاعلات البوليمراز التسلسلي (PCR). أما بالنسبة إلى أنزيم النسخ العكسي (RT) فهو من الأنزيمات الأساسية في الفيروسات القهقهرية. إذ إنه يستخدم الـ RNA الفيروسي كعارضة في تصنيع الـ DNA المتمم (cDNA) داخل الخلية المضيفة، وهي خاصية يمكن استخدامها في الهندسة الوراثية لتصنيع الـ cDNA من الـ RNA الرسول (mRNA). هذا الأنزيم يمكن عزله من خلايا حيوانية مصابة بفيروسات قهقرية، مثل، فيروس الأريمة الورمي القردي أو فيروس لوكيميا الفأر المولوني أو (MMLV).

الأنزيمات المعدِّلة للمجموعة الطرفية (Endgroup-modifying enzymes). من الضروري في أغلب الأحيان خلال تجارب الكلونة إضافة أو إزالة مجموعة فوسفات طرفية عند الموقع ´5 من شدفة الـ DNA. لهذا الغرض، تتوفر تجارياً أنزيمات الفوسفتاز القلوية وأنزيمات كيناز عديدات النيوكليوتيد.

أنزيمات المصاوغة المكانية ـ التوبوإيزوميراز ـ (Topoisoerases). وهو نوع هام من الأنزيمات القادرة على تعديل الشكل الدائري للـ DNA بإدخال أو إزالة الالتفافات الفائقة؛ إلا أنها تمتلك حالياً القليل من التطبيقات العملية في الهندسة الوراثية.

أنزيمات التلاعب بالـDNA	
أنزيمات مستخدمة في	**الوظيفة**
تفكيك الـDNA [1] أنزيم حصر , أنزيم اقتطاع نووي داخلي، [2]أنزيم النيوكلياز (الإقتطاع النووي) S1	تقطع الرابطات ثنائية الإستر الفوسفورية تقطع جدائل الـDNA المفردة أو الفراغات مفردة الجديلة
تصنيع أو ربط الـDNA [3] ليغاز الـDNA	تصليح الإنكسار المفرد الجديلة, يربط جزيئي DNA
[4] بوليمراز الـDNA	يصنع جديلة مضاعفة, يملأ الفراغ في الجديلة المفردة
[5] شدفة كلينو (Klenow)	يملأ الفراغ في الجديلة المفردة, ليس لديه فعالية إقطاع نووي خارجي بالإتجاه '5-->' 3
[6] الناسخ العكسي	يصنع DNA على قالب RNA
تعديلات مجموعات النهاية فوسفاتاز قلوي	يزيل مجموعة فوسفات من النهاية '5
كيناز عديدات النيوكليوتيد	يضيف مجموعة فوسفات إلى النهاية '5
ترانسفيراز النيوكليوتيد المتزوعة الأوكسجين الطرفية	يضيف مجموعة فوسفات إلى النهاية '3

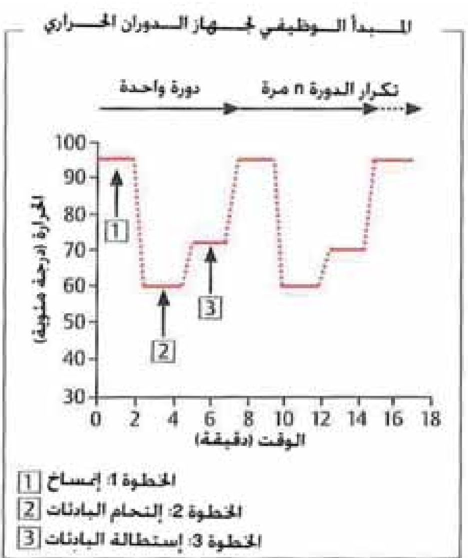


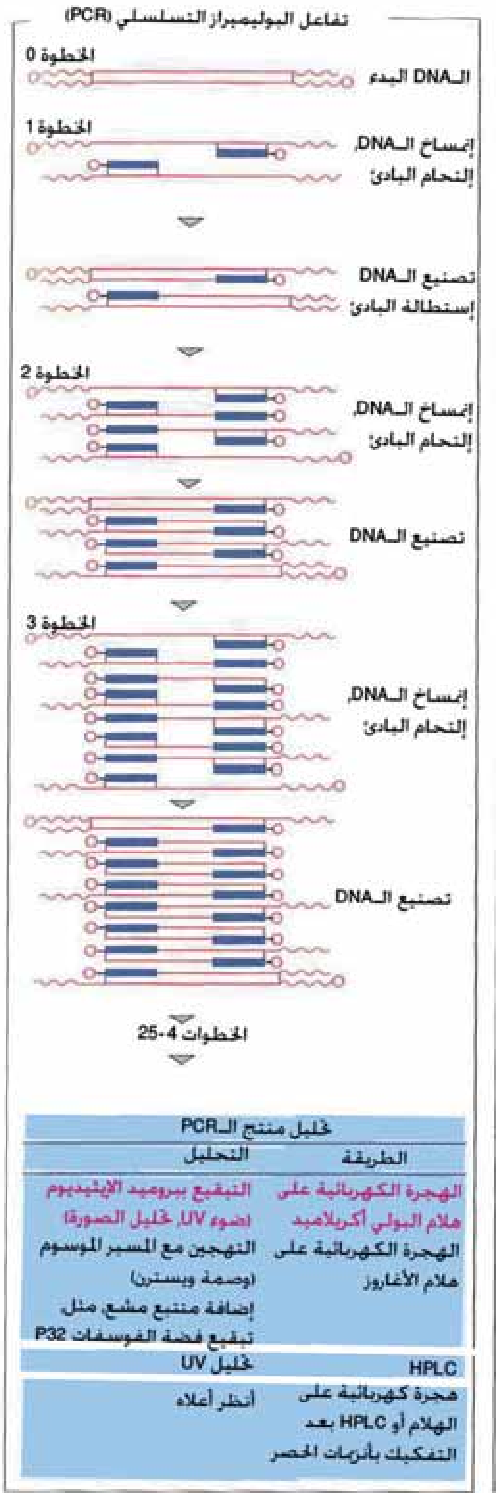
• تفاعل البوليمراز التسلسلي: الطريقة العامة
(PCR: general method)

عموميات (General). يعتبر تفاعل البوليمراز التسلسلي (polymerase chain reaction (PCR)) أحد أهم التطورات العملية في الهندسة الوراثية، وقد حصل مخترعه، كيري ميليس (Kary Mullis) على جائزة نوبل. تستخدم هذه التقنية في تضخيم أي تسلسل قصير من الـ DNA، مثلاً، جين أو شدفة جين، وذلك لمرات عديدة باستخدام أنزيم بوليمراز الـ DNA (DNA polymerase). وهي تعتبر قيمة جداً في مجال تعريف الجينات والتلاعب فيها.

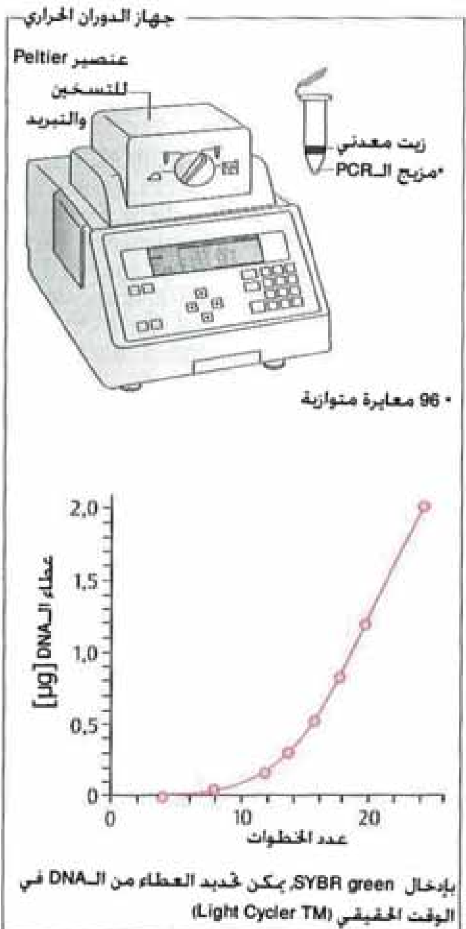
الطريقة (Method). يتطلب البروتوكول القياسي لهذه الطريقة اثنين من قليلات النيوكليوتيدات (oligonucleotides (بادئات (primers))، اللتين ترتبطان بأحد أطراف تسلسل الـ DNA المستهدف المراد تضخيمه (بادئ لكل جديلة)، ما يشير إلى أن هذه التسلسلات من الـ DNA إما أن تكون معروفة من الأصل أو يمكن تقديرها من تسلسل البروتين (في هذه الحالة، يجب الأخذ بعين الاعتبار تنوع الشفرة الوراثية المبهَم). إلى جانب عارضة الـ DNA (DNA template) والبادئين، يتطلب هذا التفاعل مزيجاً من الأزواج القاعدية الأربع وأنزيم بوليمراز الـ DNA تاك (Taq DNA polymerase)؛ بحيث يمر في ثلاث مراحل: 1) على حرارة 94ºC، ينصهر الـ DNA مضاعف الجديلة (double-stranded DNA) مشكلاً جزيئين من الـ DNA مفرد الجديلة (single-stranded DNA) (التمسخ (denaturation))، 2) بعد تخفيض الحرارة إلى ما بين 40-60ºC، يلتحم البادئين إلى جديلتي الـ DNA (الالتحام (annealing))، و3) بعد رفع درجة الحرارة إلى 72ºC، تتشكل جديلتان جديدتان متممتان (الاستطالة (extension)). وعند إعادة التسخين على 94ºC، تنفصل جدائل الـ DNA الجديدة المشكلة عن عارضتها، لتعاد دورة التفاعل من جديد بعد التبريد. لدى استخدام جهاز دوران حراري (thermocycler) أوتوماتيكي، يمكن إعادة هذه الدورة 25 ـ 40 مرة (تتراوح مدة الدورة من عدة ثوان إلى عدة دقائق اعتماداً على العارضة)، ما يؤدي إلى تضخيم الـ DNA الأصلي إلى ما بين 2^{25} و 2^{40} نسخة خلال ساعات قليلة فقط. ومن شروط تفاعل البوليمراز هذا، استخدام بوليمراز DNA قادر على تحمل الحرارة المرتفعة المطلوبة لصهر جديلتي الـ DNA بدون أن يتعطل، وهي خصائص متوفرة لدى أنزيمات بوليميراز الـ DNA الموجودة في الكائنات المجهرية المحبة للحرارة (termophilic)، مثل، *Thermus aquaticus*، أو *Pyrococcus furiosus* أو *Thermotoga maritima* (Taq أو pfu أو tma-polymerase). يقدر معدل الخطأ (تردد الطفرة لكل زوج قاعدي في دورة التضخيم الواحدة) لأنزيم بوليمراز الـ DNA تاك بحوالى $8x10^{-6}$، في حين يعتبر الأنزيمان الآخران أكثر دقة لأنهما يمتلكان القدرة على التصحيح. تقدر الكتلة المولية وعطاء الـ PCR بواسطة الهجرة الكهربائية على الهلام (gel electrophoresis) أو بالوقت الحقيقي (real time)، باستخدام مجموعات مُخبِرة مثل SYBR green (أجهزة التضخيم الخفيفة) ـ وهي عبارة عن صبغة مفلورة (fluorescent dye) ترتبط بالـ DNA مضاعف الجديلة. وبالتالي، كلما ازدادت كمية الـ DNA المنتج في تفاعل الـ PCR ازدادت كمية الصبغة المفلورة بشكل مطرد، حيث يمكن تقدير كمية الـ DNA الأصلي بواسطة التقدير الاستدلالي.

التطبيقات العملية (Pratical applications). باستخدام الـ PCR يمكن كلونة (cloning) وسَلسَلة تسلسلات معرَّفة من الـ DNA بشكل سريع. وذلك لأنه من الممكن تضخيم حتى جزيئي الـ DNA المفرد بواسطة الـ PCR، وهو ما قد تم لدى تضخيم الـ DNA من حيوان منوي واحد، إضافةً إلى تطبيقها في مجالي علم الآثار وعلم المستحثات (paleontology). تمتلك الـ PCR الأفضلية في التشخيص السريري عندما تُبيِّن الارتباط بين تسلسل الـ DNA والمرض، الذي يعتبر صحيحاً بالنسبة إلى العديد من الأمراض المعدية، وبشكل متزايد، بالنسبة إلى الأمراض المحددة وراثياً. أما في مجال الأغذية والتحاليل البيئية، فقد ساعدت طرائق الـ PCR على تحديد آثار من المواد النباتية المحورة وراثياً (transgenic) أو من الممرضات. كما أنه؛ عند معرفة تسلسلات الإجماع (consensus sequence) لعائلة بروتينية ما، يمكن تصميم بادئات للمساعدة في تعريف الأفراد غير المعروفين من هذه العائلة (الوراثة العكسية (reverse genetics))، وباستخدام بادئات معدلة أو زيادة نسبة الخطأ في تفاعل الـ PCR عمداً، يمكن إقحام طفرات إحصائية أو معروفة في البروتين. وكذلك أيضاً، من الممكن استخدام الـ RNA في تفاعل البوليمراز التسلسلي، وذلك بعد نسخه إلى cDNA الذي يمكن تضخيمه (RT-PCR)، ومن ثم استخدامه، مثلاً، في تحديد 1) كمية فيروسات الـ RNA في خلية ما (مثل، فيروس نقص المناعة المكتسب (HIV))، أو 2) الكميات النسبية من الـ RNA الرسول (mRNA) في الخلية. لقد استطاعوا بنجاح تصغير حجم الـ PCR وتطبيقاتها لتنفذ بأجهزة دقيقة شعرية («تفاعل البوليمراز التسلسلي على رقاقة» (PCR on a chip))، بحيث يمكن لدى استخدام الآلات الدقيقة المناسبة تضخيم تسلسل مرغوب من الـ DNA بعامل 2^{20} بأقل من ساعة واحدة، ليستخدم بعدها في معايرت تشخيصية إضافية، مثلاً، في صفيفة الـ DNA، (DNA array).





تحليل منتج الـPCR	
الطريقة	التحليل
الهجرة الكهربائية على هلام البولي أكريلاميد	التبقيع ببروميد الإيثيديوم (ضوء UV، تحليل الصورة)
الهجرة الكهربائية على هلام الأغاروز	التهجين مع المسبر الموسوم (وصمة ويسترن) إضافة منتبع مشع مثل تبقيع فضة الفوسفات P32
HPLC	تحليل UV
هجرة كهربائية على الهلام أو HPLC بعد التفكيك بأنزيمات الحصر	انظر أعلاه



بإدخال SYBR green، يمكن تحديد العطاء من الـDNA في الوقت الحقيقي (Light Cycler TM)

• تفاعل البوليمراز التسلسلي: الطرائق المخبرية (PCR: laboratory methods)

عموميات (General). يعتبر تفاعل البوليمراز التسلسلي بروتوكولاً أساسياً لمدى واسع من تجارب الوراثة الجزيئية. وفي هذا السياق، نناقش هنا عدداً محدوداً فقط من هذه التطبيقات، هي: 1) إدخال العناصر الفعالة وظيفياً في الـ DNA، 2) تضخيم الـ RNA، (RT-PCR)، 3) دمج شدفتين من الـ DNA، 4) إدخال شدفة جديدة من الـ DNA في الجين، 5) إزالة شدفة من الـ DNA من الجين، 6) التطفير الموجه في الوقع للجين، و7) تفاعل البوليمراز التسلسلي المضاعف (Multiplex PCR). إضافة إلى ذلك، يعتبر استخدام الـ PCR مع بادئات منحلة إجراءاً قياسياً في عزل جين غير معروف التسلسل بشكل دقيق.

إدخال العناصر الفعالة وظيفياً (Incorporation of functional elements). تشمل العناصر الفعالة وظيفياً من الـ DNA على مواقع الكلونة (تسلسلات التمييز لأنزيمات الحصر، العلامات (tags) (وهي عبارة عن تسلسلات تشفر، على سبيل المثال، لعدد من ثمالات الهستيدين عند النهاية الكربوكسيلية (C) أو النهاية الأمينية (N)، مما يسمح بالتنقية السريعة للبروتين المُترجم بواسطة كروماتوغرافيا الألفة المعدنية)، وشفرات البدء أو التوقف.

تضخيم الـ RNA الرسول (RT-PCR) (Amplification of mRNA (RT-PCR)). يمكن تضخيم الـ mRNA مباشرة بواسطة الـ PCR بعد معرفة تسلسله (الجزئي) أو تقديره من خلال تسلسل البروتين العائد له. وبذلك، يلتحم البادئ السديد الذي تم تصنيعه بالـ mRNA المعزول من الخلية، ويُترجم إلى الجديلة الأولى من الـ DNA المتمم (cDNA) باستخدام أنزيم النسخ العكسي ومزيج من النيوكليوتيدات.

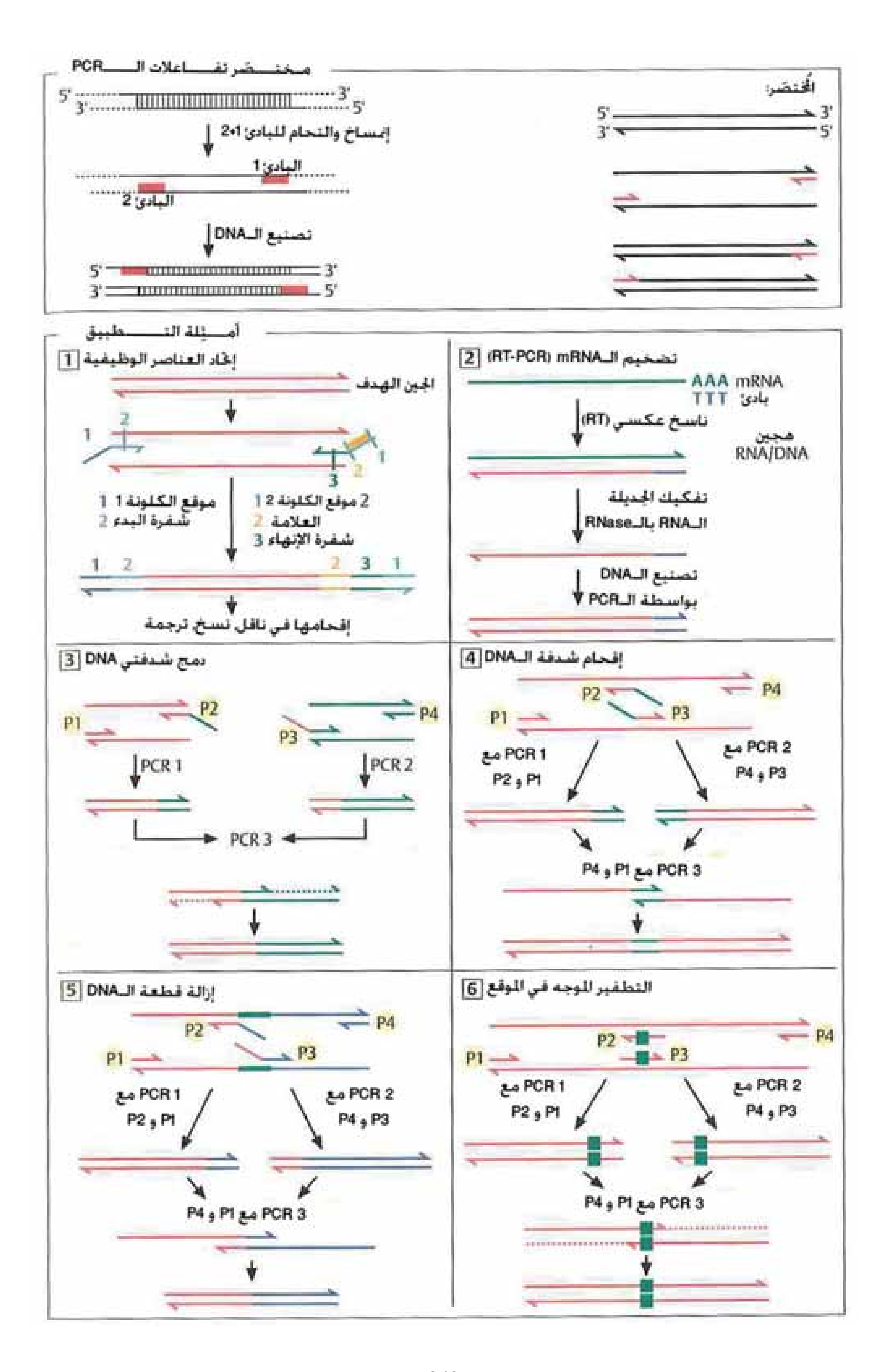
دمج شدفتين من الـ DNA (Fusion of two DNA fragments). إذا كان المراد دمج شدفتين من الجينات مع بعضهما البعض، فإنه يتم تضخيم التسلسلات المرغوبة بتفاعلين منفصلين من تفاعلات البوليمراز التسلسلي (PCR)، باستخدام مجموعة مكونة من اثنين من البادئين. وبالنتيجة، يتم تشكيل منتجات PCR تحتوي على تسلسلات متطابقة في مواقع الاندماج المرغوبة. بعد ذلك، وفي تفاعل الـ PCR الثالث، تستخدم منتجات الـ PCR السابقة كعارضات، إضافة إلى البادئين الطرفيين، مما يؤدي إلى التحام الجدائل المتتامة ذات التسلسلات المتطابقة وتضخيم منتج الاندماج. من المهم في هذا البروتوكول التأكد من الاختيار الصحيح لإطار القراءة الثلاثية. كما أنه من الضروري أحياناً إقحام مباعد - فاصل - (spacer) بين الجينين المُشفِرين، مثلاً، إدخال تسلسل مشفِر لعديد البولالانين (Polyalanine). فمثل هذه المباعدات تساعد في الحفاظ على حرية الحركة لكل من البروتينين المندمجين (من الأمثلة على ذلك، الأجسام المضادة ذات السلسلة المفردة.

إدخال أو إزالة قطعة من الجين (Insertion or removal of a gene). بشكل مشابه للاندماج الجيني، ربما يقود الاختيار الحِرَفي لبادئات التسلسلات الداخلية أو الطرفية إلى DNA مبتور (وبروتينات)، مُزالة منه القطعة المرغوبة إزالتها.

التطفير الموجه في الموقع. وهو يعتبر من التقنيات الهامة والمفيدة، على سبيل المثال، في شرح وفهم الآليات الأنزيمية أو في التعديل المستهدِف لنوعية مركب الأنزيم الأولي. تعتمد الطريقة الأقدم للتطفير الموجه على إدخال الطفرات بالـ DNA مفرد الجديلة لفيروس M13. أما الآن فقد استبدلت هذه الطريقة كلياً ببروتوكولات الـ PCR. ولأن شدف الـ DNA يمكن أن تلتحم حتى عندما يكون هناك عدم تطابق بين نيوكليوتيدات مفردة، فإن تعديل شفرة ثلاثية تؤدي إلى استبدال الحمض الأميني المرغوب من الممكن إدخالها إلى أي موقع من الـ DNA الذي يتم اختباره، كما يمكن تضخيمه بواسطة الـ PCR. إضافة إلى ذلك، تَستخدِم طريقة أخرى قليلات نيوكليوتيد متتامتين تحملان الطفرة، وبلازميد مضاعف الجديلة مؤلفاً من DNA مضافاً إليه مجموعة الميثيل مسبقاً كعارضة. في هذه الطريقة، ومع استعمال بادئات مناسبة بالإضافة إلى أنزيم البلمرة *Pfu*، يتم تضخيم البلازميد في الزجاج. بعد ذلك، تُزال عارضة الـ DNA المضاف إليها الميثيل (الدنا المضخم في الزجاج لم يضف إليه الميثيل) بواسطة الهضم بأنزيم الحصر الذي يهضم فقط الـ DNA الحامل للميثيل. وفي النهاية يستخدم الـ DNA المصنع الجديد الذي يحمل الطفرة في تحويل الـ *E. coli*، مما يجنّب ضياع الوقت في خطوات الكلونة الطويلة. حالياً، تتوفر تجارياً طواقم خاصة للتطفير قائمة على هذا المبدأ.

تفاعل البوليمراز التسلسلي المضاعف (Multiplex PCR). من الممكن تضخيم عدة تسلسلات بشكل متزامن في PCR واحد، بجمع أزواج البادئات المناسبة مع بعضها البعض.

تفاعل البوليمراز التسلسلي باستخدام البادئات المنحلة. تشكل البادئات المنحلة عائلات من التسلسلات المتماثلة الأصل من الـ DNA المفرد الجديلة التي تتضمن نيوكليوتيد واحداً أو عدة نيوكليوتيدات تمثل أيّاً من القواعد الأربعة للـ DNA. هذا الإجراء يتيح كلونة الجينات ذات التسلسل المبهم، مثلاً، في حالة اشتقاق التسلسل المحتمل من تسلسل البروتين المشفَر، وكان استخدام الشفرة غير مؤكد، أو عندما يكون الجين المراد كلونته ينتمي إلى عائلة متعددة الجينات. لذلك، في هذه الطريقة ومن أجل تصنيع البادئات المنحلة، يمكن أن تستخدم أزواج الإينوزين منقوص الأوكسجين الذي يمكن أن يتكامل مع جميع القواعد الأخرى «كقاعدة عالمية ـ شاملة ـ».


مختصر تفاعلات الـPCR
المختصر:
5'
3'
إنساخ والتحام للبادئ 1+2
البادئ 1
البادئ 2
تصنيع الـDNA
أمثلة التطبيق
1 إيجاد العناصر الوظيفية
الجين الهدف
1 موقع الكلونة 1
2 شفرة البدء
2 موقع الكلونة 2
2 العلامة
3 شفرة الإنهاء
إقحامها في ناقل نسخ ترجمة
2 تضخيم الـmRNA (RT-PCR)
AAA mRNA
TTT بادئ
ناسخ عكسي (RT)
هجين RNA/DNA
تفكيك الجديلة الـRNA بالـRNase
تصنيع الـDNA بواسطة الـPCR
3 دمج شدفتي DNA
P1
P2
P3
P4
PCR 1
PCR 2
PCR 3
4 إقحام شدفة الـDNA
PCR 1 مع P1 و P2
PCR 2 مع P3 و P4
PCR 3 مع P1 و P4
5 إزالة قطعة الـDNA
6 التطفير الموجه في الموقع

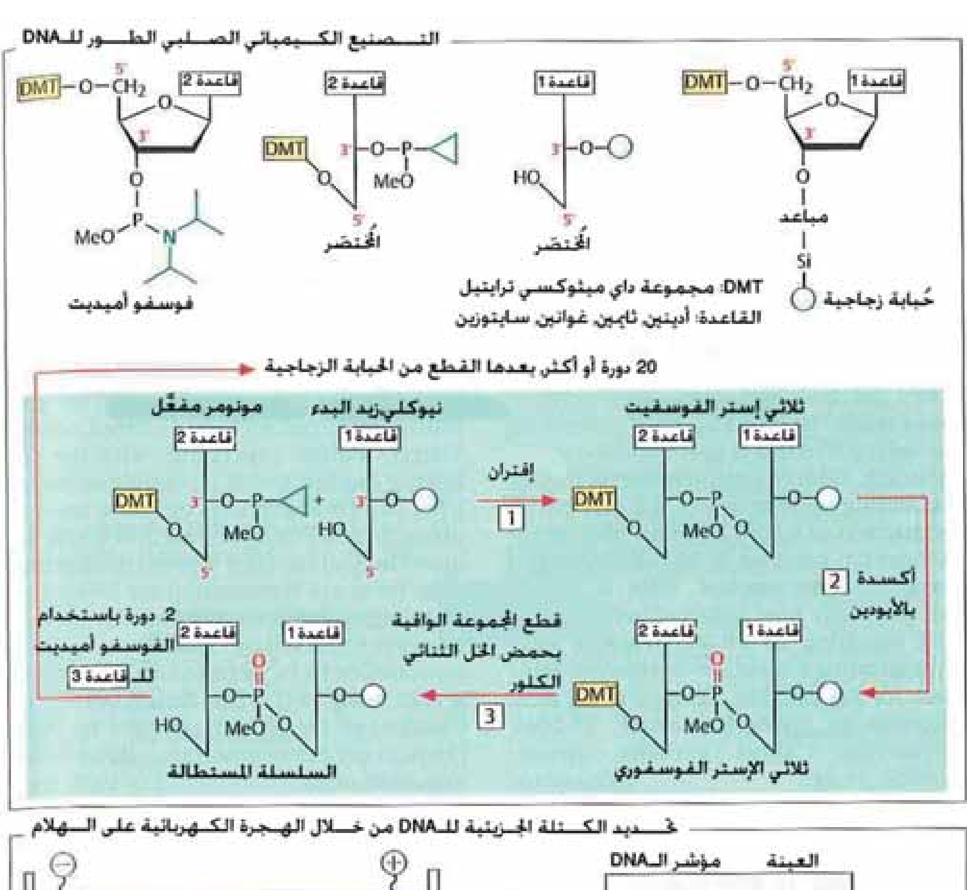
● الـ DNA: تصنيع وتحديد الحجم

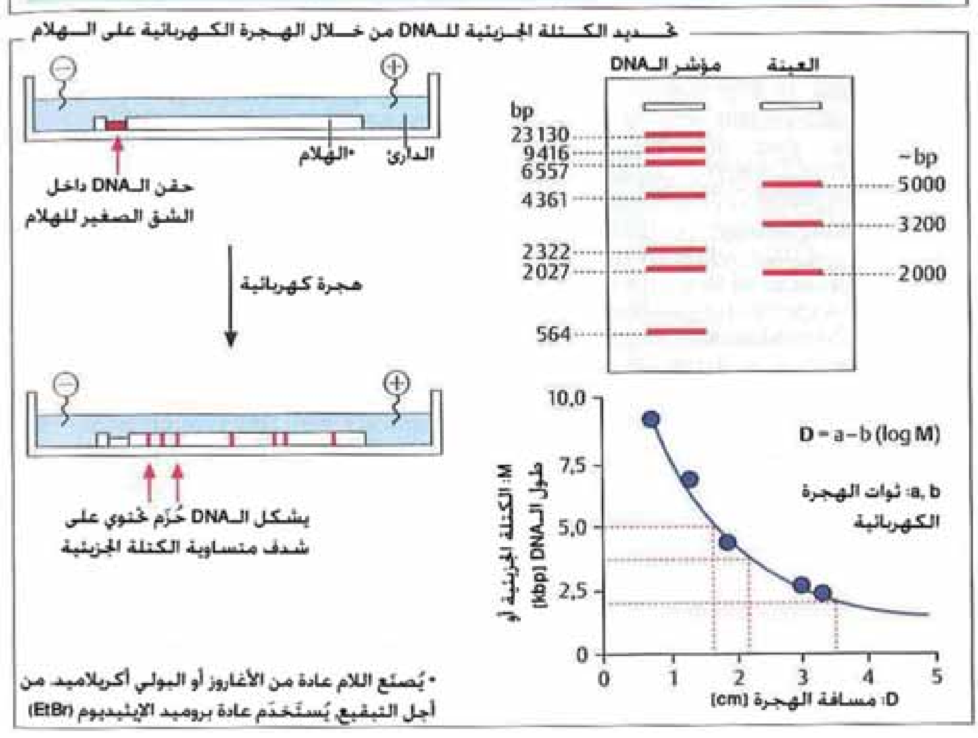
(DNA: synthesis and size determination)

عموميات (General). إن الشدف القصيرة من الـ DNA مفرد الجديلة التي يصل حجمها حتى 100bp (قليلات النيوكليوتيد) هي مواد كيميائية يمكن تصنيعها ببساطة، وسرعة، وبشكل اقتصادي في المختبر. وهي مفيدة في خطوات متعددة من الهندسة الوراثية، مثلاً، كبادئات لتفاعل البوليمراز التسلسلي (PCR). من أجل تحديد الكتلة المولية لشدف DNA ذات حجم يصل حتى 30kbp تقريباً، تستخدم تقنية الهجرة الكهربائية على الهلام (gel electrophoresis) مع شدف DNA معروفة الكتلة المولية.

تصنيع الـ DNA (DNA synthesis). تعتبر طريقة الفوسفوأميديت الطريقة المختارة لهذا العمل، التي عادة ما تنفَّذ في مُصنِّع آلي. في هذا المصنِّع، تتواجد جميع القواعد النيتروجينية الأربعة (G,T,C,A) على شكل فوسفوأميديت، بحيث تكون مجموعة الفوسفيت (phosphite) عند الموقع ´3 محمية بمركب ثنائي مصاوغ البروبل أمين (diisopropylamine) ومجموعة ميثيل، وكذلك مجموعة الهيدروكسيل عند الموقع ´5 من الريبوز منقوص الأكسجين (deoxyribose) والمجموعات الأمينية لقواعد البيورين والبيريميد التي تكون محمية أيضاً. عند هذه النقطة، يكون النيوكليوزيد الأول مرتبطاً بمادة حاملة غير منحلة، ونظراً إلى كون مجموعة الهيدروكسيل فيه على الموقع ´5 متاحة كيميائياً، فإنها تتعرض للتفاعل المانح للإلكترون (nucleophilic) من قبل مجموعة الفوسفوأميديت المفعلة بالترازول (tetrazol) في النيوكليوتيد الثاني. بعدها، تؤكسد الرابطة الفوسفاتية ثلاثية الاستير الناتجة بواسطة الأيودين (iodine) إلى فوسفات الاستر خماسية التكافؤ (5-valence phosphate ester)، لتتكرر هذه الدورة من جديد لكل قاعدة تضاف. وبخلاف التصنيع الحيوي للـ DNA، يتم هذا التصنيع الكيميائي بالاتجاه ´3 إلى ´5. في النهاية، وبعد اكتمال تصنيع شدفة الـ DNA، تزال جميع مجموعات الحماية ليتم تنقية هذه الشدفة من قليل النيوكليوتيد وحيد الجديلة بواسطة الهجرة الكهربائية على الهلام أو من خلال الكروماتوغرافيا السائلة ذات الضغط المرتفع (HPLC). إلا أنه في هذا التصنيع، حتى لو بلغ العطاء في كل دورة تفاعل 98٪، فإن العطاء الإجمالي من قليلات النيوكليوتيد المؤلفة من 20 قاعدة هو فقط 67٪ وتلك المؤلفة من 40 قاعدة هو فقط 45٪، ما يُفضي إلى تشكل مزيج من الـ DNA من الصعب تنقيته وتحليله. وبالنسبة إلى تصنيع شدف أطول من الـ DNA أو الجينات الكاملة فإن استراتيجيات معقدة تعتمد عادة على الـ PCR تكون لازمة. تستخدم غالباً قليلات النيوكليوتيد1) لتصنيع شدف من الجينات أو جينات قصيرة، 2) كمسابر (probes) أو بادئات لتعريف أو عزل شدف الجينات من الـ DNA الجينومي أو الـ DNA المتمم (cDNA) باستخدام التهجين ـ الالتحام ـ (hybridization) أو الـ PCR، 3) للتطفير الموجه في الموقع لجين ما، و4) لسَلسَلة الـ DNA. إن مهمة تصنيع الـ DNA تتولاها عادة مختبرات متخصصة بحيث تؤمن نوعية جيدة وتسليم سريع بسعر مقبول.

تحديد حجم الـ DNA (Size determination of DNA). نظراً إلى امتلاك الـ DNA شحنة عامة سالبة، فإنه يمكن فصله بسهولة بواسطة الهجرة الكهربائية على الهلام. تتألف الهلامة عادة من الأغاروز (حجم مسام كبير)، أو البولي أكريلاميد (حجم مسام صغير)، أو من كلتا المادتين بحيث تسمح بتحديد قياس الثقوب التي تساعد على التحليل السريع والدقيق لتوزع الكتل المولية لمزيج من شدف الـ DNA ذات حجم يصل حتى 30kbp. في أغلب البروتكولات، تُستخدم شروط التمسخ (SDS-PAGE): فعند إجراء الهجرة الكهربائية في هلامة بولي أكريلاميد (PAGE) بوجود مخفض التوتر السطحي الـ SDS (sodium dodecylcyl sulfate)، تكون حركة الـ DNA مفرد الجديلة (single-stranded DNA) معتمدة فقط على كتلته الجزيئية لأن تشكل البنى الثانوية وتكتل الجزيئات يتم منعه. وللكشف عن الـ DNA في الهلامة هناك عدة طرائق: إما بالتبقيع (stain) بالإثيديوم برومايد (ethidium bromide)، أو بواسطة التصوير الشعاعي الذاتي، أو باستخدام واسمات مشعة (مفلورة)، أو بوسم الـ DNA بالواسمات المتألقة مثل الرودامين: مومينول. يمثل الإثيديوم برومايد الطريقة الأكثر استخداماً، لكن نظراً إلى سمّيّته الوراثية فإنه يجب استخدامه ضمن شروط أمان مناسبة. كما أن حساسيته هي محدودة، تصل حتى أكثر من 25ng من الـ DNA. بينما الـ DNA الموسوم بالفوسفات المشع ^{32}P، باستخدام الأدينوزين ثلاثي الفوسفات (ATP) الموسوم بـ ^{32}P والترجمة المُشقَّقَة (nick-translation) بواسطة بوليمراز الـ DNA I، (DNA polymerase I)، يمكن الكشف عنه بتراكيز أقل بكثير، لكنه يتطلب تجهيزات أمان إشعاعي ومراقبة دورية للتلوث. بالنتيجة، تغدو الآن البروتوكولات الأقل تطلباً والمعتمدة على الصبغات الفلورية مستخدمة بشكل متزايد، مثل، SYBR green، التي هي حساسة أكثر من الإثيدِيوم برومايد بـ25 ـ 100 مرة، إذ تسمح بالكشف عن تراكيز أقل من 250pg من الـ DNA، حيث يتم تحليل الـ DNA في هذه الطرق في ماسح خاص بعد الإثارة بأشعة UV. يمكن تقدير الكتلة المولية لشدفة من الـ DNA بالاعتماد على مسافة هجرتها ولكن عادة ما يستخدم لهذا الغرض مجموعة من سلالم الـ DNA ذات الكتل المولية المتنوعة. إن تحليل الكتلة المولية للـ DNA هو إجراء هام في تحليل القَطْع الأنزيمي لقطع DNA غير معروفة، ولبناء خرائط الحصر، ولتعريف الجينات أو الشدف الجينية من DNA الصبغيات أو البلازميدات أو الفيروسات بعد الكلونة بالـ PCR.





• يُصنع اللام عادة من الأغاروز أو البولي أكريلاميد. من أجل التبقيع يُستخدَم عادة بروميد الإيثيديوم (EtBr)

سَلسَلة الـ DNA

عموميات (General). هناك طريقتان يمكن استخدامهما لسلسلة الـ DNA: طريقة سانجر ـ كولسون (Sanger-Coulson) وطريقة ماكسم ـ جيلبيرت (Maxam-Gilbert). تسمح كلتا الطريقتين بسلسلة الـ DNA مفرد الجديلة بطول يصل حتى 600bp. أما سلسلة الامتدادات الأطول فتُشتق عن طريق سَلسَلة شدف أقصر متراكبة (overlapping) من هذه الامتدادات. وعند سَلسَلة شدف طويلة جداً من الـ DNA، كما هو الحال في سَلسَلة الجينوم، تستخدم طرائق عالية الأتمتة تعتمد على صبغيات مفلورة خاصة بالقواعد بدلاً من الواسمات المشعة المستخدمة في الطرائق التقليدية. إن سلسلة الجينوم هي عملية متطلِّبة للغاية من حيث المقارنة الحاسوبية لعدد كبير جداً من التسلسلات (تمرين بالمعلوماتية الحيوية (bioinformatics)).

طريقة سانجر ـ كولسون (Sanger - Coulson method). في هذه الطريقة تتم كلونة (cloned) الـ DNA في بكتيريا الـ *E. coli* المضيفة المصابة بالفيروس M13، ما يُفضي إلى ذرية من العاثيات (phage) ذات DNA مفرد الجديلة (single stranded DNA). هذه الجدائل من الـ DNA تنفع بأن تستخدم كعارضات (templates) من أجل سلسلتها، باستخدام: شدفة Klenow أو، بوليمراز الـ DNA الأكثر استخداماً، T7 (T7 DNA polymerase)، وقليلات نيوكليوتيد مصنعة قصيرة كبادئ (primer)، والقواعد النيوكليوتيدية منقوصة الأوكسجين dGTP، dCTP، dTTP، و dATP كمركبات أولية (substrates). في هذا المزيج، يجري تصنيع الـ DNA مضاعف الجديلة على طول عارضة الـ DNA مفرد الجديلة؛ بحيث يُضاف إلى أربعة أوعية تفاعل متطابقة تتضمن مزيج التفاعل المذكور، أحد النيوكليوتيدات الأربعة الثنائية إنقاص الأكسيجين (dideoxynucleotides) ddGTP، ddCTP، ddTTP، أو (ddATP). ولدى إدخال أي من هذه النيوكليوتيدات في المواقع المتتامة (complementary) معها، يتوقف تصنيع الـ DNA على نحوٍ إحصائي، ما ينتهي إلى تشكيل مزيج لجميع فصائل الـ DNA المحتملة المتوقفة عند أي من نظائر هذه النيوكليوتيدات. ثم من خلال فصل مزيج الـ DNA هذا على هلام الهجرة الكهربائية، يمكن تحديد الكتلة المولية للقطع، وضمناً سِلسِلَة الـ DNA.يترافق إظهار الحزم على الهلامة بتصوير الشعاع الذاتي (autoradiography) بعد إضافة النيوكليوتيد الموسوم بالكبريت المشع ^{35}S أو الفسفور المشع ^{32}P إلى مزائج التفاعل.

وطريقة ماكسم ـ جيلبيرت (Maxam- Gilbert method). وهي طريقة قليلاً ما تستخدم في وقتنا هذا، تعتمد على التحليل (hydrolysis) الكيميائي الجزئي للـ DNA مضاعف الجديلة في أربعة تسلسلات تفاعل كيميائية مستقلة، وذلك بعد وسم أحد أطرافها.

يتضمن كل تفاعل نوعي بالقاعدة عدة خطوات (مثلاً، المعالجة بحمض الفورميك، ثنائي ميثيل السلفات (dimethyl sulfate)، الهيدرازين (hydrazine)، . . . الخ) تقود إلى قطع انتقائي (جزئي) عند هذه القاعدة على جديلة الـ DNA، ما ينتهي إلى عائلة من شدف الـ DNA الموسومة طرفياً التي يتم فصلها، كما في طريقة Sanger ـ Coulson، بالهجرة الكهربائية على الهلام وتُشاهد بالتصوير الشعاعي. يمكن أن تُنفَّذ هذه الطريقة أوتوماتيكياً، باستخدام إجراء الطور الصلب ووسم النيوكليوتيد الطرفي بواسم فلوري (fluorescent).

السلسلة ذات الأداء المرتفع (High-throughput sequencing). تعتمد الطريقة المفضلة الحالية على إجراء Sanger ـ Coulson مع التعديلات التالية: 1) سَلسَلة الـ DNA مضاعف الجديلة (double-stranded DNA) باستخدام بادئات نوعية في نوع التفاعل المعتمد على الـ PCR (سَلسَلة دورية (cycle sequencing))، 2) وسم النيوكليوتيدات الأربعة الثنائية إنقاص الأكسيجين (dideoxynucleotides) المستخدمة لإيقاف السلسلة، بقرن كل قاعدة منها بأحد الواسمات الفلورية المختلفة الأربعة. وهو ما يسمح بالكشف عن جميع النيوكليوتيدات الأربعة في معايرة (assay) تفاعل واحدة، وبتحديد الكتلة المولية لكل شدفة DNA، وذلك بعد انقضاء الوقت لفصل شدف الـ DNA بواسطة الهجرة الكهربائية المتدفقة في الهلامة، وفي النهاية، إلى سَلسَلة الـ DNA بصورة مباشرة. في هذه الإجراء، يبلغ طول القراءة حوالى 900bp، وتستغرق دورة التفاعل الواحدة حوالى 13 ساعة، بالإضافة إلى ساعتين لإعداد العملية، كما تبلغ سعة السَلسَلة في الآلات المتوفرة تجارياً التي تضم 96 ممر (lane) هجرة متوازياً، ما يناهز 100000 قاعدة خلال 15 ساعة. وفي حالة استخدم الهجرة الكهربائية الشعرية (capillary) بدلاً من الهجرة الكهربائية للهلامة، فإن طول القراءة يقلّ حتى حوالى 650bp، ويصبح زمن الفصل 3 ساعات فقط، بالإضافة إلى ساعة للضبط، وبذلك، يمكن لآلة السَلسَلة الشعرية ذات المستوى التجاري والمزودة بـ 96 أنبوب شعري أن تقوم بسلسلة 65000 نيوكليوتيد خلال أربع ساعات أو حوالى 400000 نيوكليوتيد في اليوم الواحد. كما يتوفر حالياً آلات للسَلسَلة مزودة بـ 384 أنبوب شعري. عادةً، ومن أجل تصحيح أخطاء القراءة، يُجرى تحديد السَلسَلة عدة مرات؛ والذي يُنفَّذ بالإتحاد مع حواسب فائقة لرصف التسلسل، وهي حواسب مستخدمة أيضاً في المَصنَع المخبري الحديث المجهز بعشرات أو مئات من الروبوتات العالية الأداء ما يسمح بإتمام سَلسَلة جينوم جميع الكائنات بوقت قصير.

سَلسَلة الـDNA بعد سانجر (Sanger) وكولسون (Coulson)

أ إلتحام البادئ

إقحام الجين داخل ناقل

M13mp

M13

البادئ

بوليمراز الـDNA،

dATP, dTTP, dGTP, dCTP

^{32}P- أو ^{35}S

من أجل التصوير الشعاعي الذاتي

(أدينين ثلاثي الفوسفات ثنائي إنقاص الأوكسيجين)

dideoxy-ATP (ddATP)

ب مثلًا: تصنيع جديلات الممر 1

إضافة ddATP

جميع الجديلات الجديدة تنتهي بـddATP

ddATP

بادئ

تمت إضافة ddTTP للجديلات في الممر 2، وddGTP للجديلات في الممر 3، وddCTP للجديلات في الممر

ج الهجرة الكهربائية والتصوير الشعاعي الذاتي

ddNTP

الممرات

1	2	3	4
A	T	G	C

ATTGCGATTCGddC
ATTGCGATTCddG
ATTGCGATTddC
ATTGCGATddT
ATTGCGAddT
ATTGCGddA
ATTGCGddG
ATTGddC
ATTddG
ATddT
AddT
ddA

NH_2

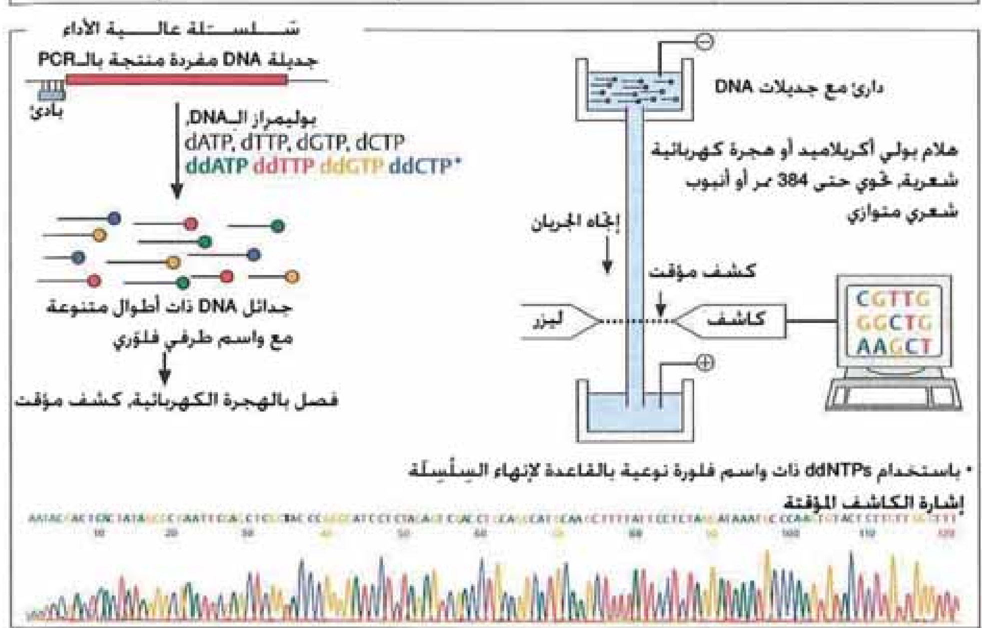
$^{-}O-\overset{O^{-}}{\underset{O}{P}}-O-\overset{O^{-}}{\underset{O}{P}}-O-\overset{O^{-}}{\underset{O}{P}}-O-CH_2$

ddATP

R

R = OH dATP، نيوكليوتيد طبيعي تصنيع الجديلة

R = H ddATP، إنهاء تطويل الجديلة



• نقل الـ DNA الغريب إلى الخلايا الحية (التحويل) (Transfer of foreign DNA in living cells (transformation))

عموميات (General). ينتقل الـ DNA في الطبيعة إلى الخلايا الحية بطرق مختلفة: 1) بواسطة البلازميدات (plasmids) أو العاثيات (phages) أو الفيروسات (الاقتران (conjugation)، التنبيغ (transduction)، التعداء (transfection))، أو 2) بالأخذ المباشر (التحويل (transformation)).

تدعى الخلايا التي أدخلت DNA غريب داخلها بالخلايا المحولة (transformed). وفي تجارب الهندسة الوراثية، يتم عادةً نقل الـ DNA الغريب (متغاير الأصل (heterologous)) ليعبر عنه في خلية مضيفة، وذلك باستخدام طرائق تحويل هي مزيج من طرائق بيولوجية المنشأ وأخرى تقنية المنشأ.

البلازميدات (plasmids). تتواجد البلازميدات بشكل حصري تقريباً في البكتريا. ومعظمها هو دائري، مكون من جزيئيات DNA مضاعف الجديلة، قادرة على التضاعف بشكل مستقل عن الصبغي البكتيري، ولكن يمكنها الاندماج بالـ DNA الصبغي مشكلة يصبوغ (episomes). تحتوي البلازميدات على نقطة بداية للتضاعف، وغالباً على جين واحد أو عدة جينات مفيدة للبكتريا، مثلاً، جين يشفر لمقاومة مضادات الحيوية. يمكن بسهولة فصل DNA البلازميد عن الـ DNA الصبغي كما يمكن التلاعب به، بشكل مشابه للأخير، بواسطة الأنزيمات في الزجاج، وهو ما قاد إلى إنشاء العديد من نواقل الكلونة والتعبير لاستخدامها في الهندسة الوراثية. تضم أهم الخصائص الوظيفية للناقل البلازميدي: 1) نقطة بداية تضاعف (*ori*) من أجل التضاعف داخل الكائن الحي المضيف؛ 2) اختياري: نقاط بداية تضاعف من أجل التضاعف في كائنات حية مضيفة أخرى (البلازميدات المكوكية (shuttle plasmids)) ـ مما يسمح ببناء ناقل مناسب لكائن يسهل التعامل معه مثل بكتريا *E. coli* قبل نقل المعلومات الوراثية إلى المضيف المرغوب الأكثر تعقيداً؛ 3) تسلسلات حصر (restriction sequences) فريدة من أجل إدخال الجين فقط في الموقع المرغوب (مواقع كلونة متعددة (Multiple cloning sites (MCS)))؛ 4) واسم واحد أو أكثر للمقاومة أو للتغذية العونية - المخلطة ـ (auxotrophic) يساعد على انتقاء الكلونات المستقبِلة الصحيحة. كما تسهل الجينات المخبِرة (reporter genes) غربلة الكلونات المحولة. على سبيل المثال، في الغربلة «البيضاء ـ زرقاء»، المستخدمة غالباً مع بلازميدات pUC، يُتَمِّم البلازميد المشفر للجين *LacZ´* الجين *LacZ´* الموجودة في بكتيريا الـ*E.coli* المضيفة والفاقدة لتسلسل جين *LacZ´* (الحذف (LacZ؛ وبالتالي يكون بمقدور فقط الكلونات المحولة من بكتيريا *E. coli* تصنيع أنزيم البيتا ـ غالاكتوزيداز (β-galactosidase) الفعال وظيفياً، الذي بدوره يحطم الصبغة البيضاء المعروفة اختصاراً بصبغة X-gal .

(5- bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D- galactopyranoside))

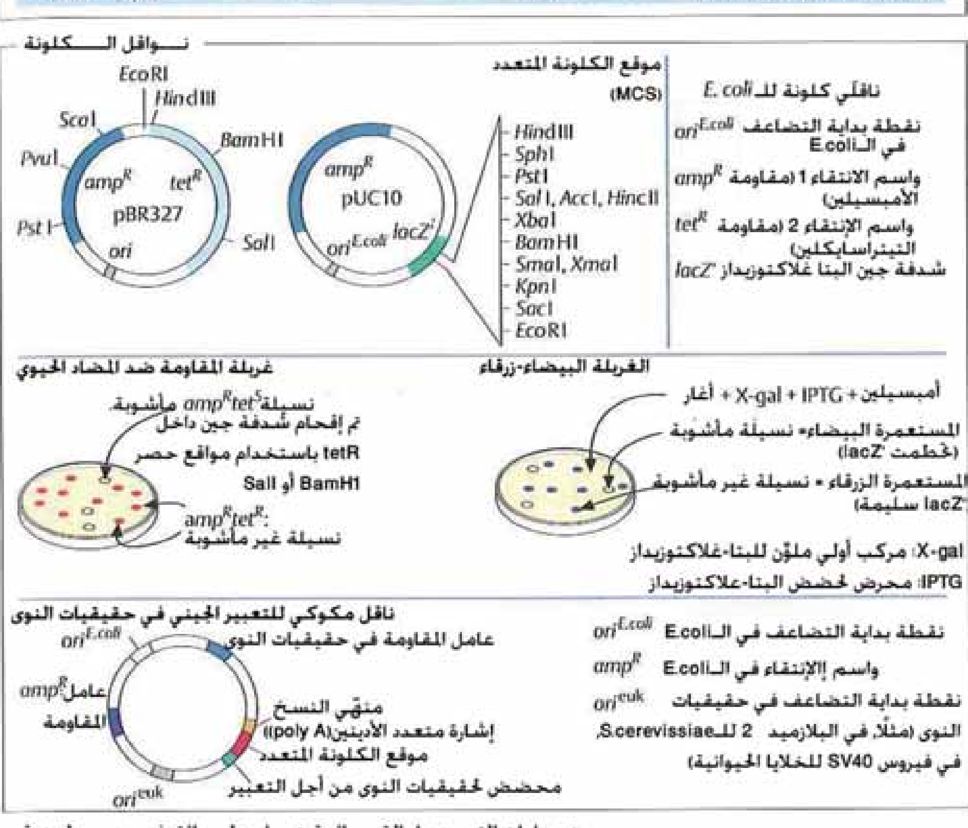
إلى 5-5´ -didromo-4,4´-dichloro indigo ذي اللون الأزرق الداكن. عادة ما تكون النواقل (vectors) البلازميدية أصغر من 10kbp بالحجم لتسهيل التلاعب بها ومنع استبعادها من الخلايا المنقسمة بسبب ضغط الانتقاء السلبي. لقد تم تطوير أغلب النواقل البلازميدية لبكتريا *E. coli*، ولكن أصبحت تتوفر أيضاً بلازميدات مفيدة في تجارب الكلونة لبكتيريا الـ Bacillus، الـ Pseudomonas، الـ Streptomyces، الـ Lactobacillus وأنواع بكتيرية أخرى. كما أصبح البلازميد Ti المشتق من بكتيريا التربة *Agrobacterium tumefaciens* ناقلاً هاماً لتحويل النباتات ثنائية الفلقة. أما بالنسبة إلى البلازميدات في حقيقيات النوى (eukaryotes) فهي نادرة، وأحد هذه الاستثناءات هو البلازميد 2 لخميرة *Saccharomyces cerevisiae*.

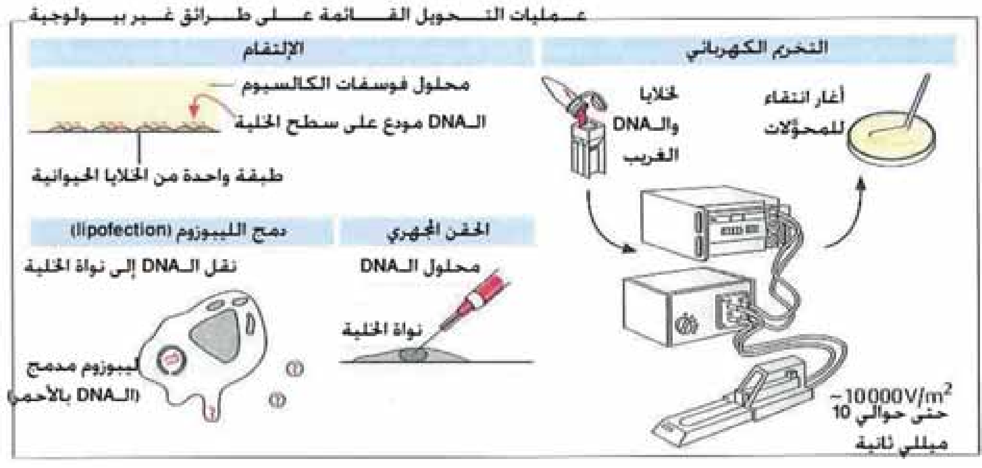
العاثيات والفيروسات (Bacteiophages and viruses). تسمح العاثيات والفيروسات بنقل الـ DNA إلى خلية المضيف عن طريق التعداء. ولتحقيق ذلك، يتم تضعيف - تخفيف ـ (attanuted) النواقل (vectors) الفيروسية والعاثية بإزالة القطع الجينية المسؤولة عن تحليل الخلية أو عن آليات إمراضية أخرى. حالياً، هناك عاثيات متخصصة لأغلب أنواع البكتريا؛ والكثير منهم مستخدم في الهندسة الوراثية مثل العاثي λ والعاثي M13 المستخدمين في التجارب على بكتيريا *E. coli*. من جهةٍ أخرى، يتوفر عدد صغير من النواقل المعتمدة على الفيروسات المضعفة لتحويل الخلايا النباتية والحيوانية.

الطرائق غير الحيوية (Nonbiological methodes). وتضم إجراءات فيزيائية وكيميائية، مثل، المدفع الجيني (biolistics) المذكور في قسم تحويل الخلايا النباتية. أما بغية تحويل الخلايا الحيوانية أو الحبلات المجردة (protoplasts) النباتية (كلاهما لا يحتويان على جدار خلوي)، فإنه من الممكن ترسيب الـ DNA كأملاح الكالسيوم على سطح الخلايا، مما يحرض التقامها (endocytosis)؛ أو يمكن استخدام التخريم الكهربائي (electroporation)، وهو عبارة عن نبضة كهربائية قصيرة الأمد تسبّب فتحاً مؤقتاً لمسام غشاء الخلية مما يسمح بأخذ الـ DNA؛ بالإضافة إلى إجراءات أخرى، تتضمن دمج الخلايا بالليبوزوم (liposme) الحاوي على DNA (lipofection)، والحقن المجهري للـ DNA (microinjection) داخل نواة خلايا حقيقيات النوى (eukaryotes). على الرغم من كثرة الطرق المستخدمة، يبقى عدد الخلايا المحولة صغيراً، ويجب أمثلة الإجراء لكل مشروع تجريبي.

البلازميدات

وجودها في	الحجم [kbp]	الأمثلة	
Escherichia coli	95	F-	بلازميدات الإخصاب f (fertility)
Pseudomonas sp.	54	RP4	بلازميدات المقاومة r (resistance)
Escherichia coli	6.4	ColE1	بلازميدات السم (الكولسين)
Pseudomonas putida	117	TOL	بلازميدات تفككية
Agrobacterium tumefaciens	213	Ti	بلازميدات الخباثة





• كلونة وتعريف الجينات

(Gene cloning and identification)

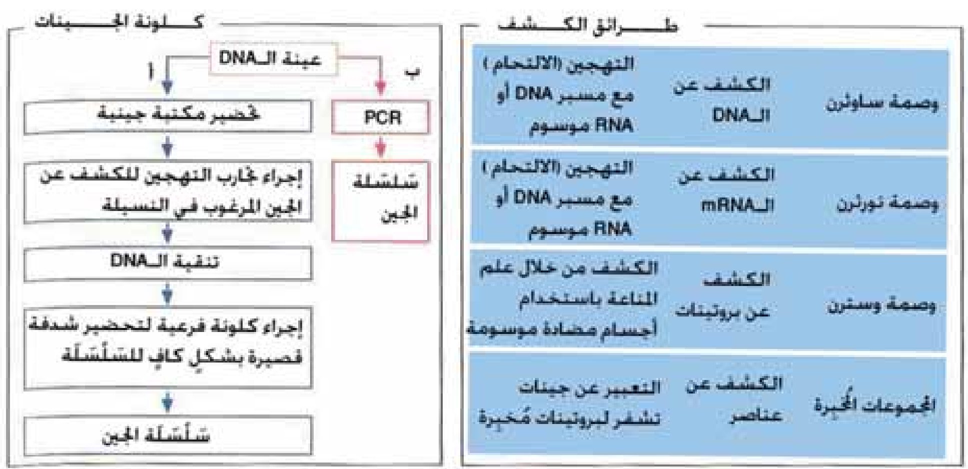
عموميات (General). كثيراً ما تستخدم طرائق الـ PCR من أجل كلونة الجينات ذات التسلسلات المعروفة أو التي يمكن معرفتها من تسلسل الحمض الأميني الجزئي للبروتين الذي تُشفِر له. أما إذا كان من المطلوب كلونة جين مبهم التسلسل أو أن تسلسله البروتيني غير معروف، فإنه يتم تحضير مكتبة جينومية (أوليات النوى (prokaryotes)) أو مكتبة DNA متمم (cDNA) (حقيقيات النوى (eukaryotes)) ووضعها في مجموعة من الكائنات الحية المضيفة المحولة (عادة *E. coli*). وبذلك لا بد للجين من أن يكون موجوداً في هذه المكتبة إذا كان منتَجه معبّراً عنه بفعالية، وعليه يكون من الممكن تعريفه بواسطة فعاليته (الكلونة بالقصف (shotgun cloning))، من خلال الـ RNA الرسول (mRNA) الخاص به (ولكن فقط إذا كان أحد منتجات الخلية الأساسية)، أو بواسطة التعريف المناعي لمنتج الجين (وصمة وسترن ((Western blot)).

الكلونة بطرائق الـ PCR (Cloning wth PCR methods). يمكن عند توفر معلومات كافية عن تسلسل الجين المرغوب أو منتَجه بناء بادئ (primer) مصنَّع يسمح بكلونة هذا الجين من الـ DNA أو الـ DNA المتمم (cDNA) باستخدام تفاعل البوليمراز التسلسلي (PCR). وفي حالة كون التسلسل الدقيق للجين المرغوب غير معروف، مثلاً، التسلسل المشتق من تسلسل الأحماض الأمينية، فإنه يجب استخدام البادئات المنحلة (degenerate primers). غالباً ما تترافق الكلونة بطريقة الـ PCR مع إقحام موقع حصر (restriction site) من أجل اللصق اللاحق داخل ناقل التعبير (expression vector).

تحضير المكتبات الجينية (preparation of gene library). يتم هضم الـ DNA أو الـ DNA المتمم (cDNA) المأخوذ من الخلايا المانحة (خلايا بكتيريا، أو نبات، أو ثدييات، أو حشرات) بأنزيمات الحصر (restriction nucleases)، ليتم تحويل الخلايا المضيفة الكفؤ (عادة بكتيريا *E. coli*) بهذه المكتبة. وحيث إنه يجب تحليل كلونات عديدة جداً ومختلفة لناحية المقحمات الجينية المتغايرة الأصل (heterologous)، فإنه من الضروري استخدام طرائق انتقاء فعّالة. وعليه، ربما تحتوي النواقل (vectors) المستخدمة في التحويل على جينات واسمة (gene markers) تمنح المقاومة ضد مضادات الحيوية، مثلاً، amp^R (مقاومة ضد الإمبيسلين) أو tet^R (مقاومة ضد التتراسكلين) بحيث تستطيع فقط الخلايا المحولة العيش على آغار (agar) الانتقاء. وفي مقاربة الإنقاذ بالواسم (marcker-rescue approach)، يتم تحويل الخلايا الطافرة عونية - مخلطة ـ التغذية (auxotrophic) لسلالة برية بشدف DNA من مكتبة جينية تحتوي على الجين المسؤول عن خصائص التغذية العونية: لتتمكن فقط الخلايا المحولة المتمَّمَة بهذا الجين من النمو على وسط فقير بدون إضافات غذائية. في العادة، هناك اثنان من الجينات الواسمة التي تستخدم: الأول لانتقاء الخلايا المحولة، والآخر يشكل جزءاً من موقع الكلونة المتعددة (MCS) التي يتم فيها إقحام الـ DNA الغريب؛ بحيث يمكن التعرف على الإقحام الناجح للـ DNA الغريب في هذه المنطقة من خلال فقدان النمط الظاهري لهذا الواسم، مثل، مقاومة مضادات الحيوية. بعد هذه الخطوات التحضيرية، يمكن الآن تحليل المكتبة الجينية لتحديد المُحولات الحاوية على الجين المرغوب.

الكشف عن الجينات ومنتجاتها (etection of genes and gene products). تعتمد غالبية الإجراءات الهامة على 1) الالتحام النوعي بالجين لمسابر (probes) من الـ DNA أو الـ RNA، و2) التعبير عن منتج الجين. في الإجراء الأول، يتم تصنيع مسبر نوعي (خاص) بالجين متمِّم لتسلسل في الـ DNA المرغوب، وكذلك وسمه إشعاعياً أو بطريقة أخرى؛ ليُستَخدم في تجارب الالتحام ـ التهجين ـ (hybridization) مع الـ DNA مفرد الجديلة (single-stranded DNA) المعزول من المُحوَّلات ـ الخلايا المحولة ـ (transformands) (وصمة ساوثرن (Southern blot))، أو بشكل مباشر بتهجين المستعمرة أو العاثية (phage). كما يمكن، وبطريقة مشابهة، تحليل الـ RNA الرسول (mRNA) المنسوخ في المُحولات باستخدام مسبر DNA أو RNA (وصم نورثرن (northern blot) موسوم. وفي حالة كون تسلسل الـ DNA للمنتج الجيني غير معروف، يمكن تجريب وصمة ويسترن (Western blot). هنا في هذا الإجراء - الثاني ـ، يتم تحضير المكتبة الجينية باستخدام ناقل تعبيري (expression vector)، فربما يجري تحديد البروتين المرغوب بتفاعل مناعي باستخدام أجسام مضادة موسومة. كما يمكن حتى اكتشاف شدف بروتينية بهذا الإجراء ـ وهي صفة مفيدة، حيث إن المورث المشفِر لهذا البروتين ربما يكون قد قطع خلال تحضير المكتبة الجينية ووُزع على اثنين أو أكثر من المُحولات. وعند البحث عن العناصر المنظمة في المكتبة الجينية، مثل المحثات (promoters)، فإن نواقل تحتوي على جين مُخبِر (reporter gene) (مثل بروتين اللوسيفراز (luciferase) أو البروتين ذي الفلورة الخضراء) خلف موقع الكلونة المتعدد (MCS) يتم استخدامها. وبذلك يتم الكشف عن المحث المعزول من المكتبة الجينية بواسطة التعبير عن الجين المُخبِر.

طرائق الكشف الأخرى (Other detection methods). تستخدم عادة طرائق الـ PCR المعتمدة على بادئات (primers) نوعية لمراقبة إقحام (insertion) جين ما في الـ DNA الصبغي. كما تقدم أنماط الحصر (restriction patterns) الدليل الأول على نجاح عملية كلونة الجين الجديد، وذلك عند ظهور أنماط حصر جديدة خلال الهجرة الكهربائية على الهلام مقارنةً بين الجينات المحولة والبرية.



طرائق الكشف

وصمة ساوثرن	الكشف عن الـDNA	التهجين (الالتحام) مع مسبر DNA أو RNA موسوم
وصمة نورثن	الكشف عن الـmRNA	التهجين (الالتحام) مع مسبر DNA أو RNA موسوم
وصمة وسترن	الكشف عن بروتينات	الكشف من خلال علم المناعة باستخدام أجسام مضادة موسومة
المجموعات المُخبرة	الكشف عن عناصر	التعبير عن جينات تشفر لبروتينات مُخبرة

وصمة ساوثرن

EcoRI 11540bp
EcoRI 997bp
BamHI 10068bp
E
A
C
pRSC 12002bp
B
EcoRI 3188bp
EcoRI 7959bp
D
Gen
A
B
C
BamHI 4467bp
BamHI 6621bp
EcoRI 6022bp
مسبر نوعي بالجين

الهضم بأنزيمات الحصر Bam H1 و EcoR1 والهجرة الكهربائية على هلام الأغاروز

مؤشر الـDNA

نقل

غشاء نايلون

هلام أغاروز

تهجين مع مسبر نوعي بالجين (هنا، مُعَلَّم بنيوكليوتيد مشع)

تصوير شعاعي ذاتي

فيلم شعاع سيني

غشاء نايلون

غشاء نايلون

فيلم الشعاع السيني الناشئ

فيلم الشعاع السيني

	BamHI	EcoRI	BamHI EcoRI
	A–B	C–D	B–C
الممر	1	2	3

مقارنة

هلام الأغاروز

DNA marker: 7kb, 6kb, 5kb, 4kb, 3kb, 2kb, 1,6kb, 1kb, 500bp

BamHI: C–A, B–C, A–B

EcoRI: D–E, B–C, A–B, C–D, E–A

BamHI EcoRI: A–B, C–D, C–A, E–C, E–A, D–B, A–B, B–C

مؤشر 1 2 3

الممر

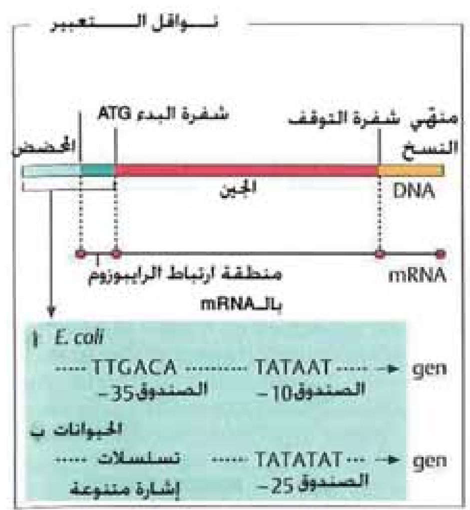
● التعبير الوراثي (Gene expression)

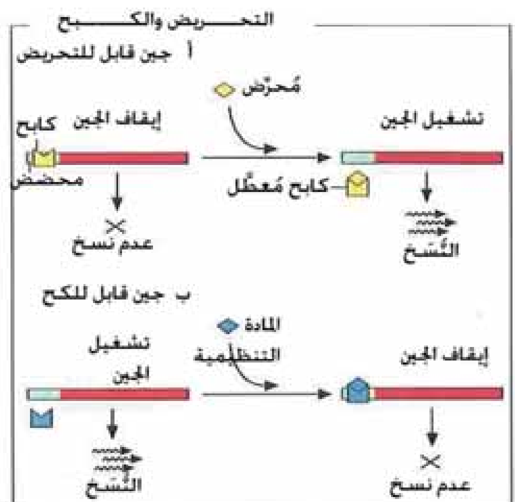
عموميات (General). يشكل التعبير عن جين غريب أو مشغل حيوي (operon) (عدة جينات متناسقة) في كائن حين مضيف هدفاً أساسياً للهندسة الوراثية. هذا الأمر يتطلب نواقل تعبيرية (expression vectors) يجري تضاعفها، اعتماداً على الكائن المضيف المختار، إما خارج الصبغي (كما هو عادة في *E. coli*) أو تندمج بـ DNA الصبغي (النموذج القياسي في جميع خلايا حقيقيات النوى (eukaryotes) العليا). في نواقل التعبير، يكون الجين الغريب في أغلب الأحيان مسبوقاً بمحضِّض محرَّض (inducible promoter) يسمح بتشغيله أو إيقافه اعتماداً على شروط خارجية ملائمة. كما أصبح ممكناً في الكائنات الحية العليا توجيه تعبير عن الـ DNA الغريب إلى الحيز المرغوب من الخلية، مثل، الصانعة اليخضورية (chloroplast) باستخدام تسلسلات قائدة (leader sequence) مناسبة.

نواقل التعبير لبدائيات النوى (Expession vectors for prokaryotes). يحتوي ناقل التعبير النموذجي للبكتريا على نقطة بداية للتضاعف (*ori*)، وجين واسم (marker gene) يمكّن من انتقاء الكلونات المحولة (transformed clones)، والجين البنيوي الغريب أو المشغل (operon) (إطار القراءة المفتوح (open reading frame) = ORF) ذي شفرة بداية (ATG) وشفرة نهاية. هناك عدة تسلسلات تمييز ـ يمكن التعرف عليها ـ (recognition sequences) تقدم الأوامر المناسبة لآلة النسخ والترجمة (transcription and translation machinery) في الخلية لتشكيل منتج الجين. ففي بكتيريا *E. coli*، يرتبط بوليمراز الـ RNA (RNA polymerase) بتسلسلات تسبق إطار القراءة المفتوح (ORF) (تدعى الصناديق 35- و10-) لينسخ الـ DNA إلى RNA رسول (mRNA). كما يتوقف النسخ عند منطقة إيقاف النسخ (trancription terminator region) التي تقع تحت إطار القراءة المفتوح، وذلك بتشكيل، في بعض الأحيان، منطقة حلقية جذعية (stem-loop region) في الـ mRNA. عند بناء نواقل التعبير، تفضل عادة المحثات المحرضة (inducible promoters). فعلى سبيل المثال، يمكن تشغيل المحث الخاص بمشغل اللاكتوز لبكتريا *E. coli* بإضافة المحرض IPTG (isopropyl-B-D-thiogalactoside) إلى الوسط؛ الذي يحرض إزالة البروتين الكابح (repressor protein) من تسلسل المشغل، ما يسمح لأنزيم بوليمراز الـ DNA بالارتباط بالمحضض ونسخ الجين إلى mRNA. تجارياً، يتوفر العديد من نواقل التعبير، وهي عادة ما تحتوي على مواقع كلونة متعددة (MCS).

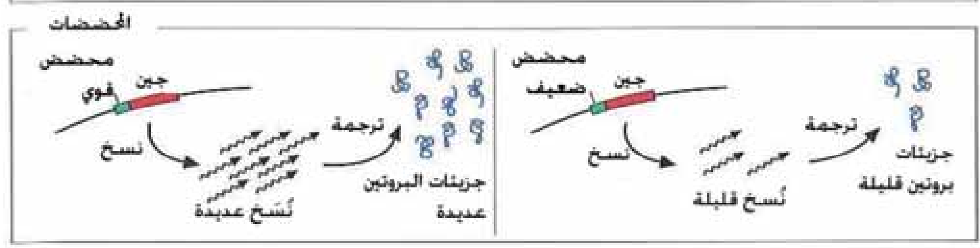
نواقل التعبير لحقيقيات النوى (Expression vectors for eukaryotes). تمتلك هذه النواقل تراكيب مشابهة لسابقتها. فهي تحتوي على واسم انتقاء، وغالباً على محث محرَّض (inducible promoter) ذي تسلسلات إجماعية (consensus sequences) (صناديق TATA، CCAAT، وGC)، وشفرة البدء (ATG)، يتبعها موقع الكلونة المتعدد، وتسلسل إيقاف (terminating sequence). يتم الحصول في خلية حقيقيات النوى على RNA رسول حامل ثمالة من 7 ـ ميثيل الغوانوزين ثلاثي الفوسفات (7- methyl- guanosine triphosphate) عند النهاية (cap) ´5 مضاف إليه ذيل متعدد الأدينين (poly A tail) عند النهاية ´3. كما يمكن أن تقود تسلسلات إشارة خاصة للتعبير عن منتج الجين في الحيز المرغوب من الخلية. نادراً ما تتضاعف نواقل التعبير للكائنات الحية العليا من حقيقيات النوى بشكل مستقل: بل تندمج عادةً بصبغي الكائن المضيف بواسطة التأشيب (recombination). ومن أجل انتقاء كلونات (clones) الخلايا الحيوانية المحولة التي تمتلك عدة نسخ من الجين المتغاير الأصل (heterologous)، فإن جينات مساعدة ضمن الناقل تتم إضافتها بحيث تمنح الخلايا المحولة مقاومة ضد مركبات سامة مضافة لوسط الزراعة. وعليه، فإن التعبير المترافق عن الأنزيم داي هايدروفولات ريدكتاز (dihydrofolate reductase (DHFR)) أو أنزيم نيومايسين فوسفوتانسفراز (neomycin phosphotransferase) مع منتج الجين المرغوب يؤمن فقط نجاة الخلايا المحولة بالجين المرغوب على وسط يحتوي تراكيز عالية من الميثوتركسات (methotrexate) أو النيومايسين (neomycin).

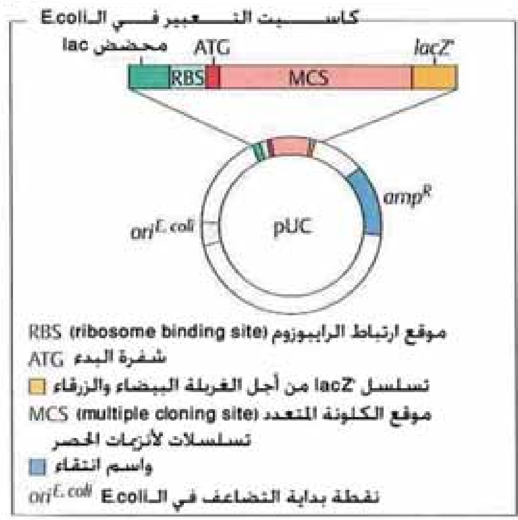
المحثات (Promoters). تضم المحثات المعروفة كلاً من المحثات القوية (strong)، والضعيفة (weak)، والمُحكَمة (tight)، وغير محكمة (loose). إن المحثات المستخدمة في العمليات التقنية يجب أن تكون قوية ومحكمة، أي أنها يجب أن تبقى غير مشغلة في حال غياب المحرض. تمثل محثات *lac*، *trp*، و*tac* المحثات النموذجية في العمليات المعتمِدة على بكتيريا *E. coli*، التي يمكن تحريضها بإضافة كاشف (reagent) إلى الوسط. في المقابل، يحرَّض المحث λP_L برفع درجة حرارة الوسط من 30 إلى 42ºC. وللتعبير عن الجينات الغريبة في الفطور والخمائر، غالباً ما يستخدم محث الغالاكتوز GAL10 في الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* والمحث AOX (alcohol oxidase) في *Pichia pastoris*، والمحث غلوكوميلاز (glucoamylase) في سلالات الـ *Aspergillus*. كما يشيع استخدام المحث ميتالوثيونين (metallothionein) للتعبير في الخلايا الحيوانية، وكذلك المحثات المنظَّمة من قبل الكائن المضيف في عمليات تحوير النباتات والحيوانات. وبالتالي، غالباً ما يُكلوَن الجين الهدف خلف المحث القوي اللاكتوألبومين (lactalbumen) للغدة اللبنية؛ بحيث يتشكل لدى هذا الحيوان البروتين المأشوب بكميات كبيرة بعد إطلاق إفراز الحليب.

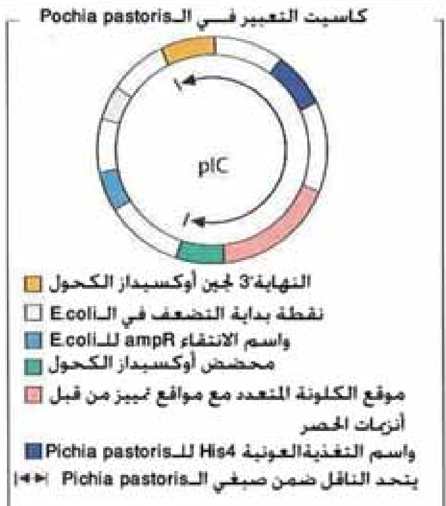




الكائن المضيف	المحرّض	البروتين	المحضض
E. coli	IPTG	بيتا-غلاكتوزيداز	*lacZ*
E. coli	الحرارة 30-42 درجة مئوية	-	λP_L
S. cerevisiae	الغلاكتوز	بيتا-غلاكتوزيداز	*GAL10*
Pichia pastoris	الميثانول	أوكسيداز الكحول	*AOX*
الخلايا الحيوانية	Zn^{2+}	الميتالوثيونيني	metallothionen







• إسكات الجينات (Gene silencing)

عموميات (General). يعتبر الإسكات المستهدف للجينات أحد التقنيات الهامة في دراسات مبادئ علم الأحياء الجزيئية وفي التقانة الحيوية، على سبيل المثال، للتخلص من الصفات غير المرغوبة في تربية وتأصيل الحيوانات البيتية والنباتات، وفي تطوير سلالات ميكروبية، وفي الطب، مثلاً، في علاج الأورام. وعلى العكس من التطفير العشوائي (random mutagenesis) المعتمد على المطفرات (mutagens) الكيميائية أو الإشعاع، فإن التقنيات الوراثية تمتلك القدرة على إنقاص (knock out) جينات محددة. وهذا يتم تجريبياً بواسطة التأشيب (recombination) أو تقنيات قائمة على استخدام الـ RNA. وعلى الرغم من النجاح الذي لا شك فيه في إسكات الجينات في بعض الحالات، إلا أن معظم الأنماط الظاهرية(phenotypes) تعود إلى عدد من الجينات (multigenic)، وعادة ما يكون صعباً، وغالباً مستحيلاً، تحديد النمط الظاهري المرغوب بوظيفة جين واحد.

إنقاص جين محدد بواسطة التأشيب (Knockout by recombination). تكون نواقل استبدال الـ DNA المستخدمة لإنشاء طفرات بإنقاص جين محدد متجانسة تقريباً مع الجين أو الإكسون (exon) المراد إسكاته (silenced)، لكنها تحتوي على طفرة أو حذف مما يؤدي إلى منتج للجين غير فعّال وظيفياً بعد تأشيب الناقل بالـ DNA الصبغي. ويَتَأَكَّدُ التأشيب الموثوق فقط إذا كان طول القطعة المُقحَمَة يتعدى الـ 150bp تقريباً، إلا أنه بسبب ندرة حدوثه (أقل من 10^{-3})، فإن الواسمات هي لازمة لانتقاء الخلايا المحولة (transformed cells). من أجل ذلك، غالباً ما تستخدم مثبطات (inhibitors) النمو، مثل، الميثوتركسات (methotrexate)، الذي يمكن التغلب على فعاليته التثبيطية بواسطة خلايا تعبر بشكلٍ كافٍ عن الدايهايدروفولات ((dihydrofolate reductase (DHFR)).

التقنيات القائمة على استخدام الـ RNA، (RNA-based techniques). في التقنيات القائمة على استخدام الـ RNA، يتم لصق الجين المراد تثبيطه بالاتجاه المعاكس ضمن ناقل التعبير المستخدم لتحويل (transformation) خلية المضيف. وبذلك يكون الـ RNA الرسول (mRNA) الذي تم تشكيله خلال نسخ الجين هذا RNA (مضاد للتعبير antisense RNA ((asRNA)) متمماً للـ mRNA الخاص بالجين الطبيعي وبالتالي يمنع تصنيع مُنتجه. فمن المحتمل أن يشكل كلٌّ من هذين الجزيئين RNA مضاعف الجديلة (double-stranded) الذي إما أن يكون لا يرتبط على الريبوزومات (ribosomes) أو يتحطم بسرعة بواسطة أنزيمات الـ RNase. إن هذه التقنية المضادة للتعبير تقدم مفهوماً جديداً ذا أهمية في العلاج الطبي المتمم للعلاج الجيني: فإذا لم يكن المرض ناجماً عن منتج الجين الخاطئ، وإنما عن تشكله المفرط، فإن استبدال الجين أقل نفعاً من التدخل بترجمته بواسطة التقنيات المضادة للتعبير. في الحقيقة، لقد انخفضت الخصائص المحرضة للسرطان في خلايا ورم الأورمة الدقيقة (gliobastoma) الناجمة عن أخطاء في تشكل عامل النمو المشابه للإنسولين (insulin-like growth factor)، وذلك مع التعبير عن الـ asRNA؛ حيث تم التعبير عنه بواسطة ناقل أبيسومي (episomal vector) يحتوي على محثّ الـ metallothionein. إن المفهوم المختلف تماماً لاستخدام الـ asRNA في الطب هو قائم على الحقن المباشر. ولأن الـ RNA يتحطم بسرعة داخل الجسم بفعل أنزيمات الـ RNases، فإن التركيز على مشابهات الـ RNA كالفوسفاثيونات (phosphothionates) محط للبحث والتحري. حالياً، يخضع العديد من الأدوية المعتمدة على الـ asRNA للتدقيق والفحص السريري، مثل، المستحضر الذي يؤخذ عن طريق الفم ضد التهاب الأمعاء Crohn (Crohn's enteritis) وعدد من المستحضرات المضادة للفيروسات. كما وقد أظهرت الدراسات مؤخراً أن الـ RNA المتدخل (RNAi) والـ RNA المتدخل الصغير (siRNA) يلعبان دوراً رئيسياً في آلية إسكات الجين الأساسية.

ومن الأمثلة العملية الناجحة على استخدام تقنية الـ RNA المضاد للتعبير، إنتاج نبات البندورة Flavr Savr™؛ التي تتميز بنكهة أفضل، وزمن أطول لنضوجها، وكذلك فترة صلاحية طويلة. لقد تضمنت عملية إنتاج هذاالنبات ربطاً لجزء من الجين المشفر لأنزيم متعدد الغالاكتويوريناز (poly galacturonas) عكسياً إلى محث RNA (RNA promoter) مشتق من فيروس موزاييك التبغ (tobacco osai virus) ثم تم نقله بواسطة الناقل Ti إلى البندورة. وكما تبيَّنَ من خلال وصمة ساوثرن (Southern blot) ووصمة نورثرن (Northern blot)، أن الجين قد أُقحم في جينوم البندورة وتشكل الـ asRNA، مما سبب الفعالية المنخفضة جداً لأنزيم الـ Poly galacturonase في الثمار الناضجة التي تم رصدها في البندورة المحولة، وبالتالي إلى فترة نضج أطول وليونة أقل. إضافة إلى ذلك، لقد تم استخدام إجراء مشابه لتحضير نباتات مقاومة للفيروسات تعبر عن asRNA مشفر لقفيصة (capsid) الفيروس الممرض للنباتات. ومثل هذه النباتات المحولة بهذه النواقل تحتوي على جينات واسمة، مثلاً، تشفرة لمقاومة مضادات الحيوية. فكان مما أشارت إليه الانتقادات أن الانتقال الأفقي لهذه الجينات الواسمة قد يقود إلى نشر مقاومة مضادات الحيوية عبر النظام البيئي.

إنقاص الجينات بالاستهداف الجيني

1 الإنتقاء الإيجابي-السلبي

الناقل
الـDNA الهدف
النتيجة

تم إسكات الإكسون 2،
تعبر المحوّلات عن جين الواسم 1 (m1)، ولكن لم تعد تعبر عن الواسم 2 (m2)

2 التعطيل بالإقحام

الناقل
ATG
الـDNA الهدف
النتيجة
فعال
صامت

تم إسكات الإكسون 3 في المحوّلات،
وتم التعبير عن الواسم 1 (m1)

3 إقحام واستئصال

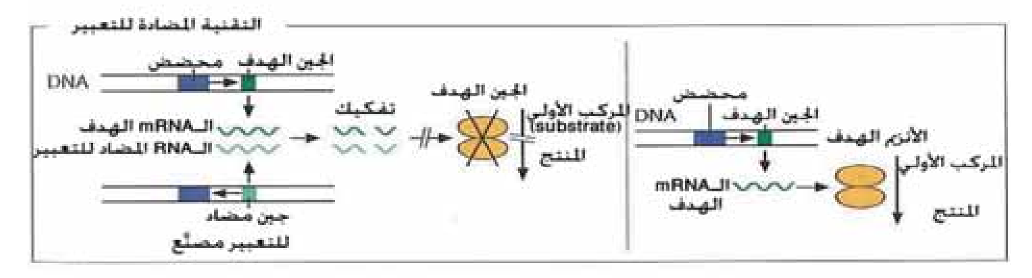
ناقل
الـDNA الهدف
مرحلة توسطية
تأشيب ضمن الصبغي
النتيجة

تأشيب
محضض
واسم انتقاء إيجابي
واسم انتقاء سلبي
إكسونات
نقطة الواسم

يقع كل من m1 و m2 خارج التسلسل المأشوب.
يقود الاقحام إلى مضاعفة التسلسل المأشوب.
فُقدت وظيفة الاكسون 2 بالتأشيب ضمن الصبغي ، ولم يُعبّر عن الـm1

واسمات الانتقاء لحقيقيات النوى

الواسم	النوع الخلوي	المؤشر
منتخٌ دي أميناز الأدينوزين	طافرات خلايا مبيض الهمستر الصيني (CHO)	9-β- كزايلوفورانوكسيل (xylofuranoxyl)
المسيطر ريدكتاز الداي هايدرو فولايت	الجميع	ميثوتريكسات (methotrexate)
بروتين الاندماج كيناز الثايميدين الناقل لفوسفات النيومايسين	الجميع	سلفات النيومايسين
ميتالوثيونين I	الجميع	Zn^{2+} ،Cd^{2+}



● لـ RNA

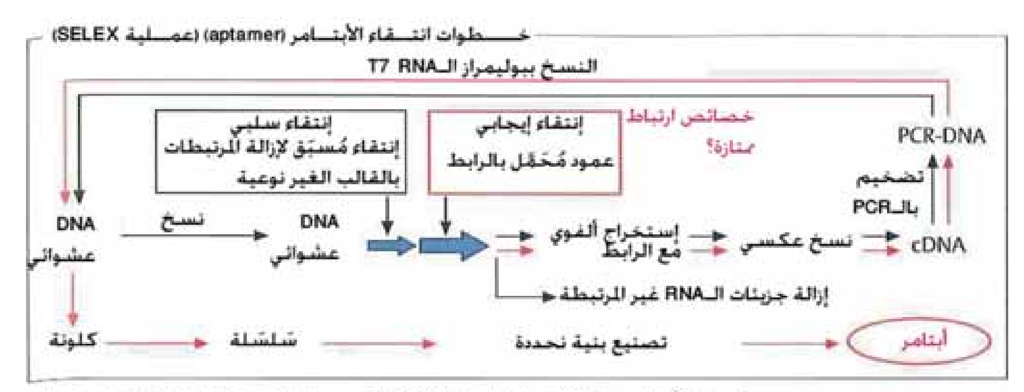
عموميات (General). كثيراً ما هو معتقد أن الجينوم المُؤسَس على الـ DNA، وهو البرنامج الوراثي للغلاف الحيوي في عالمنا اليوم، قد كان مسبوقاً بشكل من الحياة أبسط حيث كان التكاثر معتمداً على الـ RNA. في التقانة الحيوية، تلعب التقنيات القائمة على الـ RNA دوراً كبيراً وهاماً. والأمثلة على ذلك هي (1) الـ aptamers المعتمدة على الـ RNA كجزيئات ألفة حيوية (bioaffinity)؛ (2) إجراءات معتمدة على الـ RNA الرسول (mRNA) لتحضير بروتينات في الزجاج؛ (3) قدرة الـ RNA المتدخل على إسكات وظائف الجين؛ و(4) النواقل المعتمدة الـ RNA في العلاج الجيني.

الـ Aptamers. هي عبارة عن ربائط من الحمض النووي الاصطناعي ترتبط بؤلفة (affinity) عالية مع الجزيئات المحبة للماء كالببتيدات والأدوية. لقد تم في عملية SELEX (التطور المنظومي للربائط بواسطة الإغناء المطرد غربلة مكتبات اندماجية ضخمة من الأحماض النووية المصنعة (10^{14} ـ 10^{15} جزيء مختلف) بحثاً عن ارتباط مع الجزيء الهدف. ثم باستخدام تقنية الـ RT-PCR تم تضخيم تلك التسلسلات التي أبدت ارتباطاً مع الجزيء الهدف وجرى نسخها في الزجاج، لتؤمن في كل دورة مكتبة فرعية ذات خصائص ارتباط أكثر كفاءة. في النهاية تم عزل الـ aptamers الذين يتمعون بقدرة ارتباط ضمن المجال الأدنى من النانو مولار (nM) لتتم دراستها في كل من التشخيص والتطبيقات العلاجية، على سبيل المثال، في التعطيل الانتقائي لفعالية أحد الجينات.

التعبير عن البروتينات من دون خلية (Cell - free protein expression). لقد جرى تطوير تقنيات من أجل تصنيع البروتينات في الزجاج، بدءاً من عارضة DNA. فباستخدام حلولة *E coli* (lysate) مؤشلة، تحوي على أنزيم بوليمراز الـ RNA، وRNA ناقل (tRNAs)، وريبوزومات، وأحماض أمينية، وأدينوزين ثلاثي الفوسفات (ATP)، أمكن تصنيع بروتين بكمية تصل إلى بعض الميليغرامات (mg) في غضون 24 ساعة. وبذلك اسُتخدمت هذه الطريقة على نحو مفيد لتحري المعوقات في النسخ، والقيام بالتعبير عن بروتينات مثل أنزيمات البروتياز أو الببتيدات المضادة للبكتريا التي تسبّب تسمّماً للكائن المضيف. إن الأجهزة التي تؤمن استخدام هذه التكنولوجيا هي متوفرة تجارياً.

اسكات وظائف الجين (Silncing gene functions). تنخرط جزيئات الـ RNA في خطوات هامة لمعالجة المعلومات الوراثية كالقطع والوصل للاكسونات وتصنيع البروتينات. لقد اعتُبر تدخل الـ (RNA)، الذي يعرف أيضاً بعملية إسكات الجينات في مرحلة ما بعد الترجمة، آلية لتنظيم التعبير الوراثي وتوسط المقاومة ضد جزيئات الـ RNA الممرضة ذات المنشأ الداخلي والخارجي مثل فيروسات الـ RNA («الجهاز المناعي للجينوم»). كما يمكن للـ RNA، في بعض الآليات المذكورة أعلاه، أن يصبح فعالاً بالتحفيز (الرايبوزيمات)، على سبيل المثال، لدى قيامه بفصل الروابط الفوسفاتية ثنائية الإستر من دون وجود أي بروتين. إن العديد من هذه الآليات يتم التحري عنها لتستخدم في التقانة الحيوية. فالـ RNA المضاد للتعبير ـ التقنية التي نوقشت تحت عنوان الإسكات الجيني ـ تم استعماله بنجاح من أجل إزالة فعالية أنزيم متعدد الغلاكتويوريناز في إنضاج ثمار البندورة Flavr Saver™)، مؤدياً إلى نكهة أفضل من دون تجعد للجلد. لقد جرى استكشاف الريبوزايمات القاطعة للمحوِّلات (أي الريبوزومات التي تقطع جديلة غريبة من الـ (RNA في المعالجة ضد فيروس نقص المناعة المكتسبة (HIV) وسرطان الثدي وسرطان القولون والمستقيم حتى مرحلة الطور الثاني من التجارب السريرية. إذ يمكن تطبيقها في هذا المجال، على سبيل المثال، من خلال تسريبها إلى الخلايا الليفاوية $CD4^+$ أو $CD34^+$، وهي الخلايا السالفة لتكون الدم، المأخوذة من المريض المصاب والقيام بتضخيمها في بيئة اصطناعية خارج الجسم (ex vivo). إن الـ mRNA يمكن أن يُحطم في العديد من خلايا حقيقيات النوى، وذلك من خلال عملية تعرف باسم تدخل الـ RNA، (RNAi): حيث إن وجود RNA مضاعف الجديلة يُفعل أنزيم الـ RNase القادر على تمييز وهضم الـ mRNA الموافق الداخلي المنشأ، من خلال استخدام الـ RNA المضاعف الجديلة كعارضة. تعتمد هذه الآلية على القطع العشوائي للـ RNA المضاعف الجديلة بأنزيم الـ RNase (DICER)؛ بعد التفعيل الأنزيمي المعتمد على الأدينوزين ثلاثي الفوسفات للشدف المفردة الجديلة المولّدة خلال هذه العملية، يمكن لهذه الشدف أن تلتحم بشكل نوعي مع الـ mRNA ليتم التعرف عليها من قبل الـ RNase، الذي يحطم الـ mRNA. فعلى سبيل المثال، عندما يعبَّر عن RNA اصطناعي مضاعف الجديلة مناسب خلف محث بوليمراز الـ RNA III)، (RNA polymerase III (Pol III))، فإن التعبير الوراثي لفيروس نقص المناعة (HIV) يثبَّط بشكل كبير في الخلايا المصابة ترافقياً ـ بالفيروس المُمرض والناقل المحوِّل ـ.

العلاج الجيني (Gene therapy). إن وصف كيفية استخدام نواقل الـ RNA الفيروسي في العلاج الجيني عند الإنسان قد تم تناوله في مكان آخر. ولكن في هذا السياق، وبشكل عام، لقد استخدمت خلاصات الـ RNA الرسول (mRNA) من أورام لدى الإنسان بنجاح من أجل تحويل الخلايا الوحيدة المأخوذة من نفس المريض، ما أفضى إلى خلايا متشجرة ناضجة محمَّلة بالـ RNA الورمي، الذي يحفز الجهاز المناعي لدى المريض، عقب تسربه، ليشكل اللمفاويات التائية السامة للخلايا المضادة للورم.



بعض الأبتامرات المشتقة من الـRNA المرتبطة بالبروتينات الخارج خلوية

الهدف	Kd (nM)	الحمض النووي
مستقبل الأسيتيل كولين	2.0	RNA
عامل نمو الأورمة الليفية القلوي (PDGF)	0.35	RNA
الإنترفيرون-γ	6.8	RNA معدل في الموقع '2
عامل نمو الخلايا القرنية (KGF)	0.0003	RNA معدل في الموقع '2

التصنيع الحيوي للبروتينات في الزجاج

عارضة DNA
بروتين
حيز التفاعل
ترجمة
البوليمراز T7
نسخ
tRNAs
رايبوزومات
الغشاء
نيوكليتيد
فوسفات ثلاثية
أحماض أمينية
بيروفات الفوسفو
إينول
مستقلبات
منتجات ثانوية
مركبات أولية
غير مستهلكة
حيز التغذية

معقد الأبتامر

مع الفيتامين B12 (1DDY_5)

الـRNA المتدخل-RNAi

RNA مفرد الجديلة
"شاذ"
بوليميراز الـRNA المعتمد على الـRNA
RNA فيروسي أو RNA مضاعف الجديلة آخر
RNA مضاعف الجديلة
RNase يقطع عشوائياً ("DICER")
RNAi مزدوج
~21 نيوكليوتيد
ATP
معقد RNAi مفعل
معقد تحريض الإسكات بالـRNA (RISC)
يحتوي على أنزيم نقتطاع نووي داخلي
الـmRNA الهدف
AAAAAAAA
تمييز الهدف
mRNA مفكك تم إسكاته

المكتبات الجينية والخرائط الجينية

(Gene libraries and gene mapping)

عموميات (General). تعتبر حتى الجينومات الصغيرة للعاثيات (phages) والفيروسات، كبيرة جداً بالنسبة إلى السَلسَلة المباشرة للـ DNA أو الـ RNA الخاص بها. لذلك، يتم قطع الـ DNA الجينومي إلى شدف، ثم يُكلوَن في نواقل (vectors)، بغية الاقتراب تدريجياً من حجم الشدف الممكن سلسلتها. وبعد إتمام سَلسَلة هذه الشدف، يتم تحليل (analyze) معلومات التسلسل بواسطة الحاسوب لتوضع على شكل خريطة كاملة لتسلسل DNA أو RNA الجينوم (خريطة فيزيائية (physical map)). ونظراً إلى وفرة التسلسلات ذات القواعد المتطابقة، فإن تسلسلات الجينوم الأكبر تعتبر صحيحة فقط إذا ما تم تحديد واسمات (markers) كافية (إعداد الخريطة الجينية (gene mapping)). ومن الواسمات الهامة على الصعيد التطبيقي هي المواقع ذات التسلسل المُعلَّم (sequence tagged sites (STS)).

المكتبات الجينية (Gen libraries). تتألف من مجموعة شدف الـ DNA، التي تشكل مع بعضها البعض الجينوم الكامل. يتم تحضيرها عن طريق قَطع الـ DNA الجينومي إلى قِطع أصغر، باستخدام الأمواج فوق الصوتية (ultrasound) أو أنزيمات الحصر (restriction enzymes)، ثم القيام بإقحام هذه القطع الناتجة في نواقل (vectors). ولتحضير قطع كبيرة، يفضل اختيار أنزيمات الحصر التي تقطع عند تسلسلات نادرة، مثل، الأنزيم *Not I* الذي يُميِّز (recognize) الموقع ´3 ´GCGGCCGC 5 المتواجد مرة كل 4^8=65536 زوج قاعدي (bp). وبالتالي يعتمد تواتر حدوث تسلسل ما في أي جينوم بشكل قوي، على محتوى الـ DNA من الـ GC وكذلك على وجود تسلسلات مكررة من الـ DNA.

النواقل (vectors). لتحضير الخرائط الجينية بغية السَلسَلة، تتم كلونة (cloning) شدف الـ DNA الجينومي ضمن نواقل تمكّن من تضخيمها بسهولة لدى نقلها إلى خلايا المضيف التي تسمح بدورها بإعادة عزل هذه النواقل منها. والذي يحدد عدد الكلونات المطلوبة لإنشاء مكتبة جينية كاملة هو حجم الـ DNA الجينومي. أما بالنسبة إلى الناقل المختار لجينومات حقيقيات النوى الضخمة فهي الصبغيات الاصطناعية (الصبغيات الاصطناعية الخميرية أو البكتيرية (yeast/bacterial artificial chromosomes (YACs/BACs))؛ التي تتيح تعبئة مقحمات (inserts) بحجم يصل حتى 2Mbp. إلا أن هذه القطع تبقى كبيرة جداً للسَلسَلة، لذلك يجري عادة القيام بكلونة فرعية (subcloning) باستخدام النوافل المشتقة من الفيروس ة، مثل، ناقلات كوزميد (cosmids) التي تسمح بتعبئة شدف من الـ DNA الغريب بحجم 30-45kbp.

تخريط الجينات أو إعداد الخرائط الجينية (gene mapping). تعتمد الطريقة التقليدية في إعداد الخرائط الجينية على ملاحظة الأنماط الظاهرية (phenotypes) المقترنة. على سبيل المثال، تم منذ زمن بعيد إعداد الخرائط الجينية لفطور الـ Ascomycetes مثل *Neurospora Crassa* والخميرة *Saccharomyces Cerevisae* بواسطة تحليل الرباعيات (tetrad analysis). فبسبب امتلاك جميع الخلايا الإبنة (doughter cells) الموجودة ضمن زق واحد، التسلسل ذاته الذي شكَّلَهم خلال الانقسام المنصِّف (meiosis)، فإنه يمكن بسهولة عزل الأبواغ وتحليل خصائص أنماطها الظاهرية. لقد وسَّعت الوراثة الجزيئية هذه الطرائق بقوة؛ بحيث يمكن من خلال الجينومات الأصغر، توليد شدف حصر (restriction fragments) وسَلسَلتها مما يقود غالباً إلى رسم الخرائط الفيزيائية لموقع الجين بشكل مباشر. وباستخدام مسابر (probes) مختارة جيداً لتفاعل البوليمراز التسلسلي (PCR) أو لالتحام (hybridization) الـ DNA، فإنه يمكن أيضاً الحصول على واسمات وراثية لجينومات أكبر. فمن الإجراءات الهامة المتبعة في هذا السياق، التهجين في الموقع المُفَلْوَر، (fluorescence in-situ hybridization (FISH)) لتسلسل كبير من الـ DNA. كما يمكن الحصول على دقة عالية (ضمن 10kbp إذا ما جمعت هذه الطريقة مع طريقة تمشيط الـ DNA، (DNA combing). فلهذا الغرض، تُغمس شريحة مغطاة بمتعدد اللايسين (polylysine) في محلول يحتوي على قطع كبيرة من الـ DNA، وعند سحب الشريحة ببطء من المحلول، فإن شدف الـ DNA هذه سوف تصطف بشكل متوازٍ، مؤمنة شروط مثالية للالتحام ـ التهجين ـ مع الواسم.

المواقع ذات التسلسل المعلَّم (sequence tagged sites (STS)). وهي عبارة عن تسلسلات من الـ DNA بطول 100 ـ 500 زوج قاعدي، التي تتواجد مرة واحدة فقط في كامل الجينوم. ما يشير إلى أن هذه المواقع لا تضم تسلسلات موجودة في الـ DNA المتكرر. غالباً ما تؤمَّن هذه المواقع من مكتبات كلونة تحتوي على شدف جينوم كبيرة، مثل، مكتبة BAC أو YAC. بينما تستخدم المكتبات الصبغية الخاصة إذا ما أريد تحليل جينومات كبيرة لحقيقيات النوى. وهكذا، باستخدام هذه المكتبات، يمكن عزل صبغيات فردية بعد تبقيعها (staining) بصبغة مفلورة وفرزها بواسطة جهاز قياس تدفق الخلايا (flow cytometry) (فرز الخلايا المفعلة بالفلورة (fluorescence-actvated cell sorting (FACS))، وذلك لأن كمية الصبغة المرتبطة بالصبغي تعتمد على حجمه. ثم بعد إيجاد المواقع ذات التسلسل المُعلَّم لجينوم ما، فإنه يسهل باستخدام البادئات (primers) المناسبة لتفاعل الـ PCR، معرفة فيما إذا كانت هذه المواقع مجاورة لبعضها البعض في الجينوم أو أنها بعيدة عن بعضها: فإذا كانوا قريبين من بعضهم بعضاً، يجب أن تعطي مجموعة من شدف الجين المتراكبةمن المكتبة الجينية شدف جين ملتحمة إضافية تحمل ذات الموقع (STS). وعليه، تعتبر واسمات الـ STS «كواشف خرائط» (mapping reagents) ممتازة لتحليل الارتباط الجزيئي لقطع جين ما.

المكتبات الجينية

الكائن	جينوم أحادي الصيغة الصبغية b	عدد النسائل اللازمة (P=95%) الناقل-λ (EMBL4) a=17 kbp	الكوزميد a=35 kbp	BAC a=250 kbp	YAC a=1000 kbp
E. coli	4800000	850	410	56	13
S. cerevisiae	14000000	2500	1200	167	41
Drosophila melanogaster	170000000	30000	14500	2036	508
البندورة	700000000	123500	59000	8387	2096
الإنسان	3000000000	529000	257000	35948	8986
الضفدع	23000000000	4053000	1969000	275602	68901

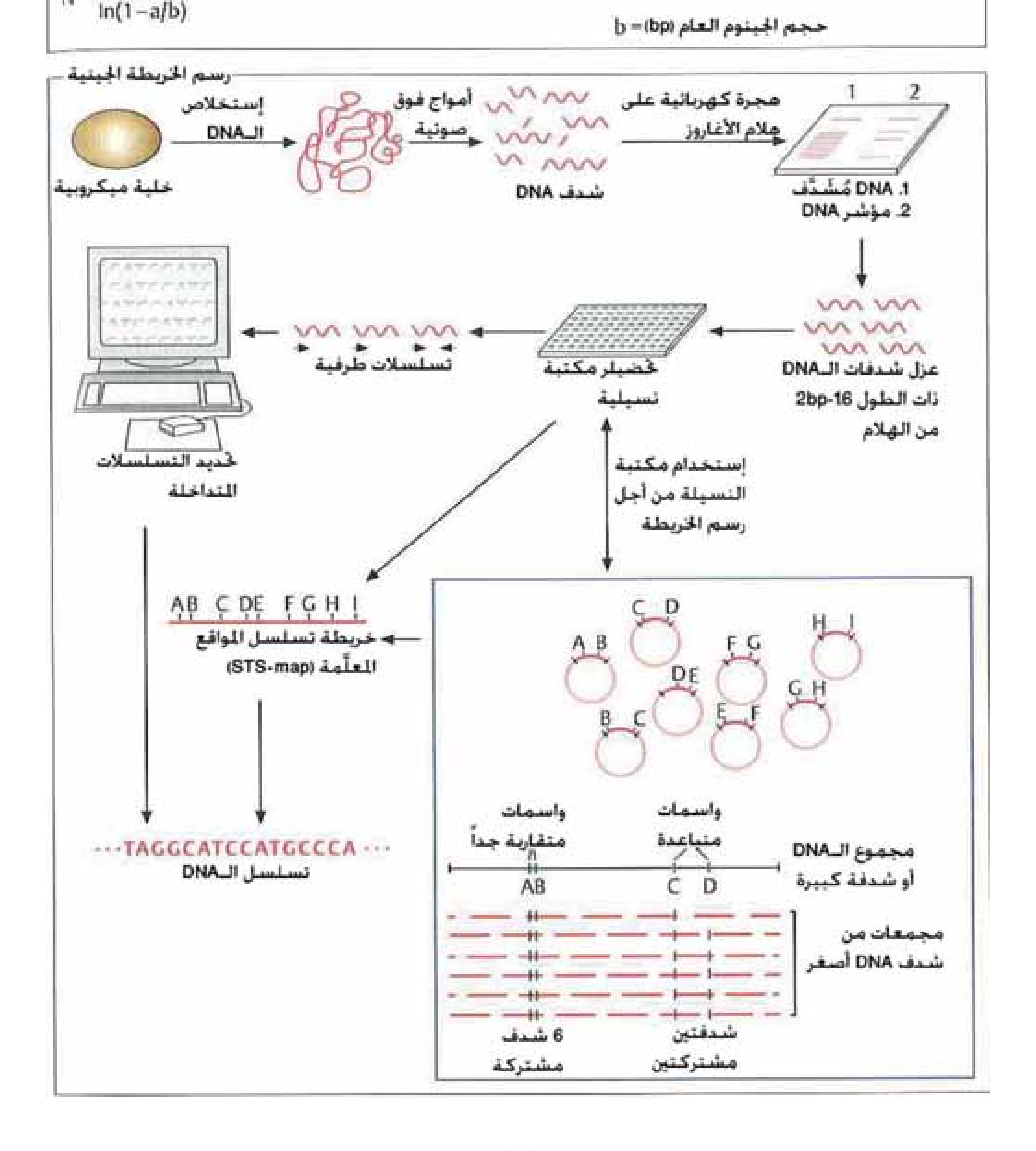
$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-a/b)}$$

P = الإحتمالية

معدل طول مُقحَمات الـDNA في الناقل (bp) = a

حجم الجينوم العام (bp) = b

رسم الخريطة الجينية



الخرائط الوراثية لبدائيات النوى

(Genetic maps of prokaryotes)

عموميات (General). لقد تم تحضير الخرائط الوراثية للكائنات المجهرية من خلال ملاحظة التغيرات بالنمط الظاهري (phenotype) بعد الاقتران (conjugation) (انتقال الـ DNA من الخلية المانحة إلى المستقبلة)، وبعد التنبيغ (transduction) (انتقال قطع من الـ DNA بين البكتريا بواسطة العاثية (phage))، وبعد التحويل (transformation) (أخذ الـ DNA البلازميدي (plasmidic) أو المجرَّد (nacked)). من جهة أخرى، تم تحضير خرائط الجينوم الفيزيائية (التسلسل الكامل لـ DNA جينوم ما)، التي تعود إلى عام 1995، بإعداد خرائط متجاورة النسيلة (clone contig mapping) أو بالقصف (shotgun).

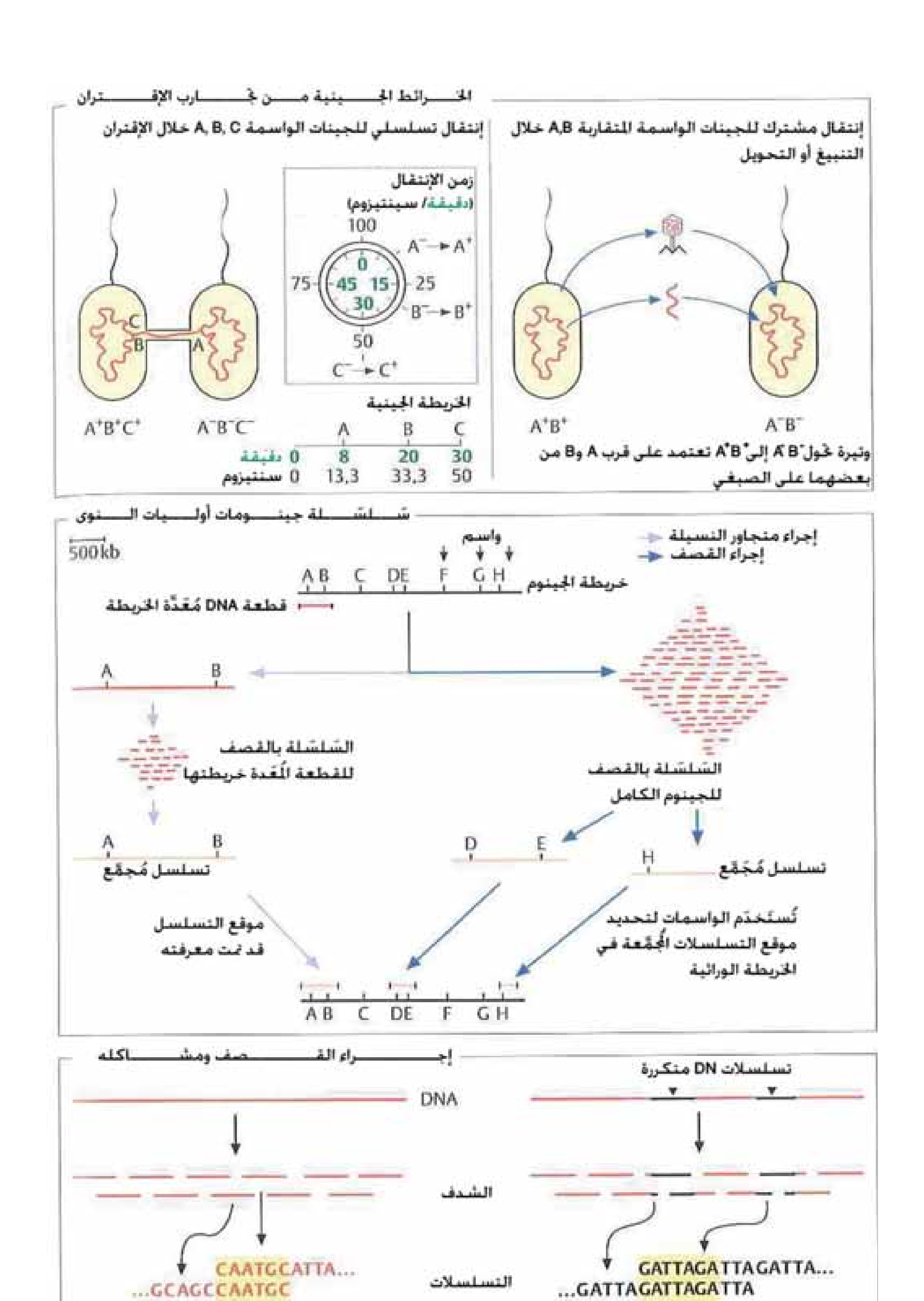
الخرائط الوراثية (Gene libraries). هناك العديد من التغيرات في النمط الظاهري (phenotype) التي يمكن ملاحظتها بسهولة وسرعة عند البكتيريا. لذلك، يمكن استخدام فقد القدرة على تشكيل أبواغ أو سياط (flagella)، أو إدخال مقاومة مضادات الحيوية كواسم نمط ظاهري. فبغية توضيح المسارات الأيضية (metabolic pathways)، تمت دراسة الطفرات المعاقة (blocked mutants)، التي فقدت القدرة على تنفيذ خطوة أو أكثر من المسار، لفترة طويلة من خلال إضافة جزيئ سالف بإمكانه التغلب على هذا الفقد.

إضافة إلى ذلك يُعتبر قصر زمن التوالد عند العديد من أنواع البكتريا (أقل من 1 ساعة) ميزة هامة لدى علماء وراثة الميكروبات. إذ يمكن عند ملاحظة تعديلين لنمطين ظاهريين في خلية مستقبلة مرتبطين بقياس الزمن المطلوب للاقتران (congugation) أو التنبيغ (transduction)، تقدير مسافة الجينات المشفرة لهذين النمطين الظاهريين. (تحليل الارتباط (linkage analyses)). وبذلك اختُصر زمن وضع الخرائط الجينية لأوليات النوى إلى دقائق أو centisomes. ويقدر الوقت المطلوب للنقل الكامل لجينوم *E. coli* إلى خلية مستقبلة بـ 100 دقيقة على حرارة 37ºC.

خرائط الجينوم الفيزيائية: خرائط متجاورة النسيلة (Physical genome maps: clone contig maps). من المَهمات الهامة في سَلسَلة الجينوم تحديد تلك النسيلات (clones) في المكتبة الجينومية المحتوية على تسلسلات DNA مجاورة. يمكن أن تترافق متجاورات النسيلة (contigs clone) للجينوم الكامل مع تقنيات تبصيم النسيلة (clone fingerprinting). وبالتالي، فإن وجود خرائط حصر (restriction maps) أو مواقع ذات تسلسل معلَّم (STS) متداخلة، في نسيلتين يشير إلى أنهما يحتويان على أجزاء متداخلة من تسلسل الجينوم، ويمكن استخدامها لاستنتاج التسلسل الإجمالي بمساعدة برامج حاسوبية. كما يمكن أيضاً حين تكون متاحةً، استخدام الواسمات (markers) المرتبطة بالنمط الظاهري من الخرائط الوراثية. أما بالنسبة إلى الكلونة الموضعية (positional cloning) للجين بدءاً من واسم مجاور، فإن طريقة السير على الصبغي (chromosome walking) هي المستحدمة في أغلب الأحيان. في هذه المقاربة، يمكن تحضير RNA موسوم من النسيلة البدائية من أجل تجارب التهجين (hybridization)، أو يتم تركيب بادئات (primers) من التسلسل الطرفي للنسيلة لتستخدم من أجل تحضير منتج الـ PCR من النسيلة المجاورة، التي يُشتبه بأن يكون الجين المرغوب فيها. في النهاية، يتم تحديد تسلسل الـ DNA للجينوم الكامل خطوة بخطوة باستخدام خريطة وراثية غير مكتملة كعارضة.

إعداد خرائط الجينوم الفيزيائية: طريقة الاستهداف (Physical genome mapping: shotgun method). تعتمد هذه الطريقة التي تحفظ الوقت على مبدأ إمكانية تحديد أي تسلسل DNA بطول 600bp بشكل مباشر. لذلك، يتم في هذه الطريقة قطع الـ DNA الجينومي بواسطة أنزيمات الحصر (restriction enzymes) أو الأمواج فوق الصوتية إلى شدف صغيرة متداخلة معروفة تسلسل الأطراف فيها. عندئذٍ يمكن استخدام حاسوب فائق لتجميع تسلسل الجينوم بالاعتماد على التداخلات المسَلسَلة. ونظراً إلى الكفاءة العالية للحواسيب المتقدمة والحديثة، فإن هذا الإجراء يسمح برسم خريطة جينوم ميكروبي (1-5Mbp) خلال أسابيع أو حتى أيام، اعتماداً على عدد المُسَلْسِلات المتوفرة. ولأن الخرائط الوراثية التي تحتوي على تسلسلات واسمة غالباً ما تكون متوفرة (عند سَلسَلة جينوم *E. coli* الذي تم البدء به عام 1990، كان هناك 1400 واسم والذي يشير إلى معدل مسافة بين الواسمات بقدر 3300bp على الجينوم البالغ 4.64M bp)، فإن النتائج الحاسوبية التي يتم الحصول عليها عن طريق السَلسَلة بالقصف يمكن التأكد منها باستمرار. مع نهاية عام 2000 جرى تحديد التسلسل الكامل أو معظمه لأكثر من 200 جينوم ميكروبي، كما أدى تفحُص هذه التسلسلات إلى معلومات وافرة عن مواقع الجينات. ومن خلال مقارنة الجينومات ووحداتها الوظيفية، تنبثق نظرة موحدة عن الجزيئات الأيضية الهامة في الحياة.

المعلوماتية الحيوية (Bioinformatics). تهدف البرامج الحاسوبية المستخدمة بمشاريع الجينوم بشكل أساسي لتحديد التسلسلات المتشابهة بشكل موثوق. إذ تقود حتى الأخطاء النادرة للسَلسَلة (دقة 99٪) إلى أخطاء عملية في جميع تسلسلات الجينات المسجلة مما يجعل مقارنة النتائج من تجارب سَلسَلة متعددة أمراً ضرورياً.



الخرائط الجينية من تجارب الإقتران
إنتقال مشترك للجينات الواسمة المتقاربة A,B خلال التنبيغ أو التحويل
إنتقال تسلسلي للجينات الواسمة A, B, C خلال الإقتران
زمن الإنتقال
(دقيقة/ سينتيزوم)
100
0
45
15
30
75
25
50
A⁻→A⁺
B⁻→B⁺
C⁻→C⁺
الخريطة الجينية
A
B
C
0 دقيقة
8
20
30
0 سنتيزوم
13,3
33,3
50
A⁺B⁺C⁺
A⁻B⁻C⁻
A⁺B⁺
A⁻B⁻
وتيرة تحول A⁻B⁻ إلى A⁺B⁺ تعتمد على قرب A وB من بعضهما على الصبغي
سلسلة جينومات أوليات النوى
500kb
إجراء متجاور النسيلة
إجراء القصف
واسم
خريطة الجينوم
A B C DE F G H
قطعة DNA مُعَدّة الخريطة
السَلسَلة بالقصف للقطعة المُعَدة خريطتها
السَلسَلة بالقصف للجينوم الكامل
تسلسل مُجمّع
تسلسل مُجَمّع
موقع التسلسل قد تمت معرفته
تُستَخدَم الواسمات لتحديد موقع التسلسلات المُجَمّعة في الخريطة الوراثية
إجراء القصف ومشاكله
تسلسلات DN متكررة
DNA
الشدف
التسلسلات
CAATGCATTA...
...GCAGCCAATGC
تسلسل متداخل
GATTAGATTAGATTA...
...GATTAGATTAGATTA
إصطفاف خاطئ
500bp

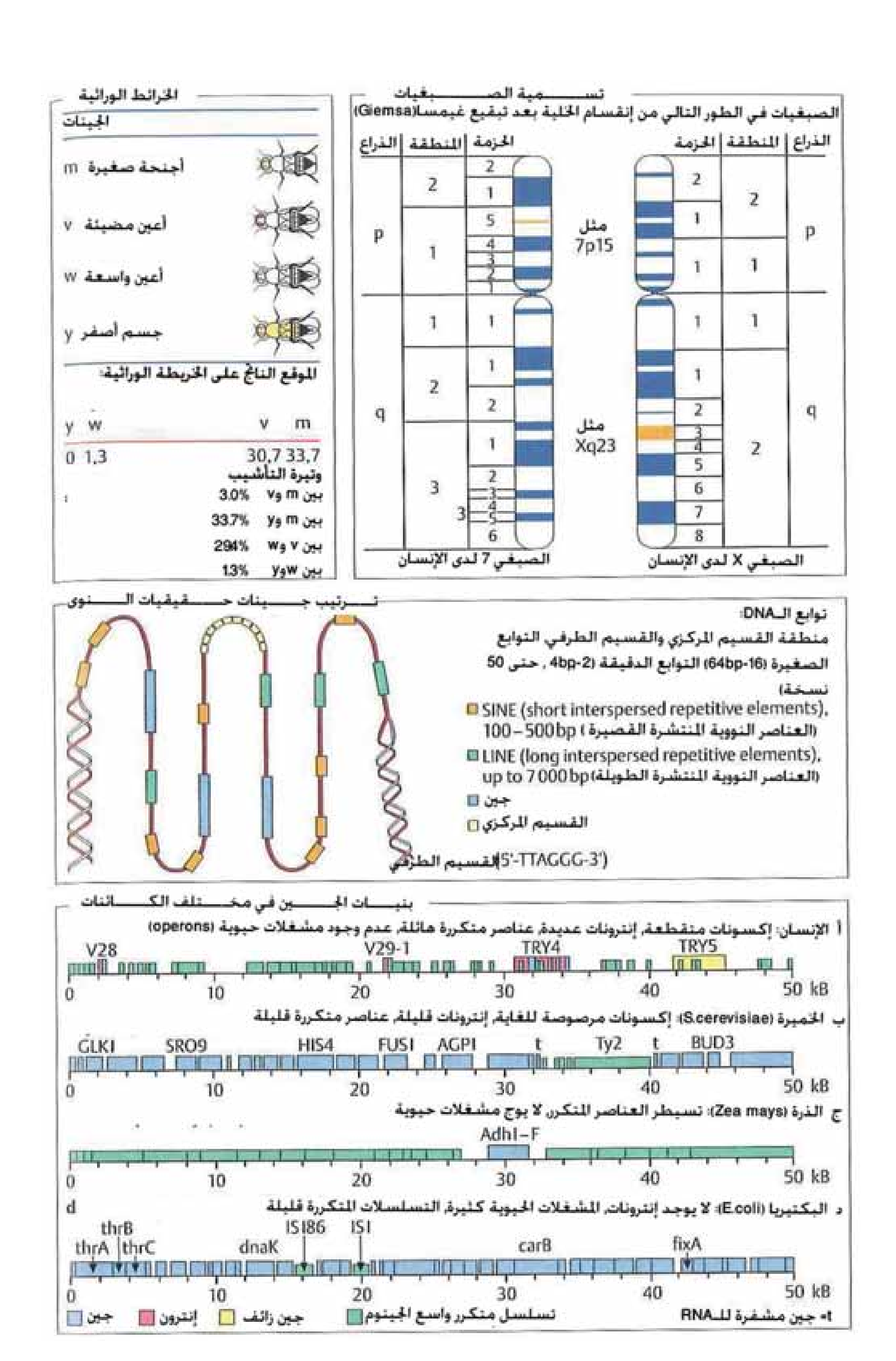
الخرائط الوراثية لحقيقيات النوى

(Genetic maps of eukaryotes)

عموميات (General). تُعد الخرائط الوراثية لحقيقيات النوى على نحوٍ مشابه لخرائط بدائية النوى (prokaryotes)، وذلك بواسطة تحليل اقتران الأنماط الظاهرية (phenotypes) الوراثية. لكنه نظراً إلى ثنائية (diploid) أو تعدد (polyploid) الصيغة الصبغية في حقيقيات النوى، يمكن أن ينشأ تسلسل الجين المسؤول عن النمط الظاهري من أنماط وراثية مختلفة (متخالف اللواقح (heterozygous)) تنفصل عن بعضها البعض خلال الانقسام المنصِّف (meoisis). كما أن حجم جينوم هذه الكائنات الكبير الذي يبلغ عادة عدة بلايين من الأزواج القاعدية، واحتواءه على إنترونات وعدد هام من تسلسلات الـ DNA المتكررة، يعيق البحث عن التسلسلات الفريدة. وعلى الرغم من هذه الصعوبات، فقد أُنجزت سَلسَلة جينومات عدد من الكائنات حقيقية النواة (الخميرة، الفطور، الدودة، الذباب، الإنسان، الفأر، الجرذ، الأربيدوبسيس، الأرز) وأخرى هي في طور الإنجاز (مثلاً، سمكة زيبرا).

الخرائط الوراثية (Genetic maps). تعتمد الخرائط الوراثية في الحيوانات المتاحة للتجارب، على الأنساب المرتبطة بتحليل الارتباط: على ملاحظات كيفية ارتباط خصائص الأنماط الظاهرية (phenotypes) خلال التكاثر الجنسي، أي، بواسطة التصالب في الانقسام المنصِّف (meiotic crossing over) (انظر إلى كتب الوراثة). إذ يحدث التوريث المشترك لشكلين ظاهريين مُشفَر لهما بجينين قريبين من بعضهما البعض على الصبغي بنسبة أكبر من شكلين ظاهريين مُشفَر لهما بجينات بعيدة عن بعضها البعض. وبالتالي، يقود تواتر التأشيب (recombination) للأنماط الظاهرية المقترنة، إلى خريطة وراثية فعلية يُعبِّر عن أبعاد الجينات فيها نسبة تواتر التأشيب. هذه الطريقة التقليدية، تُتَمَّم في يومنا هذا بالعديد من طرائق الوراثة الجزيئية؛ حيث يمكن تحديد البصمة الوراثية للعديد من شدف الـ DNA المتقاربة من حيث العلاقة ومقارنتها بواسطة إعداد خرائط الحصر (restriction maps)، ومن ثم يمكن استخدام البادئات (primers) المُعَلَّمَة بوسمات مفلورة (fluorescent markers) لتحديد مواقع الجينات ضمن شدف كبيرة من الـ DNA أو الصبغيات عن طريق التهجين في الموقع المُفَلْوَر (fluorescence in-situ hybridization (FISH)).

سَلسَلة الجينوم (Genome sequencing). يحتوي جينوم الكائنات العليا على تسلسلات DNA متكررة (DNA تابع (satellite DNA)، تسلسلات Alu، وعوامل وراثية متنقلة قهقرية (retrotranspsons)، . . . إلخ)، مما يجعل التحديد الدقيق لتسلسل ما ضمن الجينوم العام أمراً صعباً. لذلك، تشكل العناصر النووية المنتشرة القصيرة (short interspersed nuclear elements (SINE)) التي يتراوح طول كل عنصر منها بين 10-500bp، مثل، تسلسل Alu، 20٪ من جينوم الثديات، والعناصر النووية المنتشرة الطويلة (long interspersed nuclear elements (LINE)) التي يتراوح طول العنصر فيها بين 6000-7000bp، 10٪ من جينوم الثديات. إضافة إلى تشكيل التابع الصغير (mini-satellites) والتابع الدقيق (micro-satellites) 5٪ أخرى. في الإنسان، يتألف الـ DNA التابع الدقيق من 10 إلى 50 نسخة، وهو ذي تسلسل قصير متكرر جداً مثل AC أو ACCC المتواجدة أكثر من 10000 مرة والموزعة على كامل الجينوم. ولأن لدى كلّ شخص توزعاً فريداً للـ DNA التابع الدقيق، فإن ذلك يجعل من هذه التوابع واسمات وراثية (genetic markers) ممتازة، مثلاً، في الأدلة الجنائية، وفي تربية (breeding) الحيوانات البيتية. إلا أنه نظراً إلى الوفرة العالية للتسلسل المتكرر، فإن سلسلة الجينوم بطريقة القصف (shotgun sequencing)، المفيدة جداً في جينومات أوليات النوى (prokaryotes)، تلقى الكثير من الصعوبات في جينومات حقيقيات النوى. بالنتيجة، فإن طريقة السلسلة المتجاورة (contig sequencing) للنسيلات (clones) المتداخلة هي المستخدمة بشكل واسع بالترافق مع طريقة السير على الجينوم (genome walking)، واستخدام المواقع ذات التسلسل المُعَلَّم (STSs) وعلامات التسلسلات المعبر عنها (expressed sequences tags (ESTs)) كواسمات. فهذه المواقع (STSs) والعلامات (ESTs) تقدم معلومات مُتَمِّمَة. إذ تمتد الـ STSs على كامل الجينوم، ولكنها لا تميز بين المناطق المشفرة وغير المشفرة، كما قد تتضمن تسلسلات تكرارية. بينما تتكون الـ ESTs من تسلسلات قصيرة مشتقة من نسيلات (clones) الـ DNA المتمم (cDNA)، وبما أن تحضير الـ cDNA يتم عبر تحويل الـ RNA الرسول (mRNA) الخاضع لعمليات القطع والوصل (splicing)، إلى DNA مضاعف الجديلة (doule-sranded DNA) بواسطة أنزيم النسخ العكسي (RT)، فإن تسلسلات ESTs لا تحتوي على تسلسلات تكرارية ولكل منها تسلسل فريد. ولكن إذا جرى تهجين ـ التحام ـ (hybridization) بادئات (primers) مشتقة من تسلسلات EST مع مكتبة جينومية، فلا يمكن كشف جميع الإنترونات (introns) والتسلسلات التكرارية، إلا أنه يمكن تحديد النسيلات الحاوية على كامل المورثات المعبَّر عنها أو على شدف منها. بالخلاصة، تكمل كل من ESTs وSTSs بعضها البعض بشكل جيد ككواشف في إعداد الخرائط الجينية. وبمجرد ربط النسيلات من المكتبة الجينومية بخريطة فيزيائية للجينوم من خلال واحدة أو أكثر من الطرائق المذكورة أعلاه، فإنها تُتبَع بكلونة فرعية (subcloning) لنسيلات الكوزميد أو BAC أو YAC ضمن مكتبات العاثية λ، تليها عملية سَلسَلة الـ DNA. بعد ذلك، تُحلَّل التسلسلات المتداخلة ببرامج متجاورات التسلسل لتكوين التسلسل الكامل لـ DNA أحد الصبغيات، وفي النهاية لكامل الجينوم. حيث إن هذه الخريطة الحاسوبية تُزَوّد بمعلومات مشتقة من خرائط وراثية.



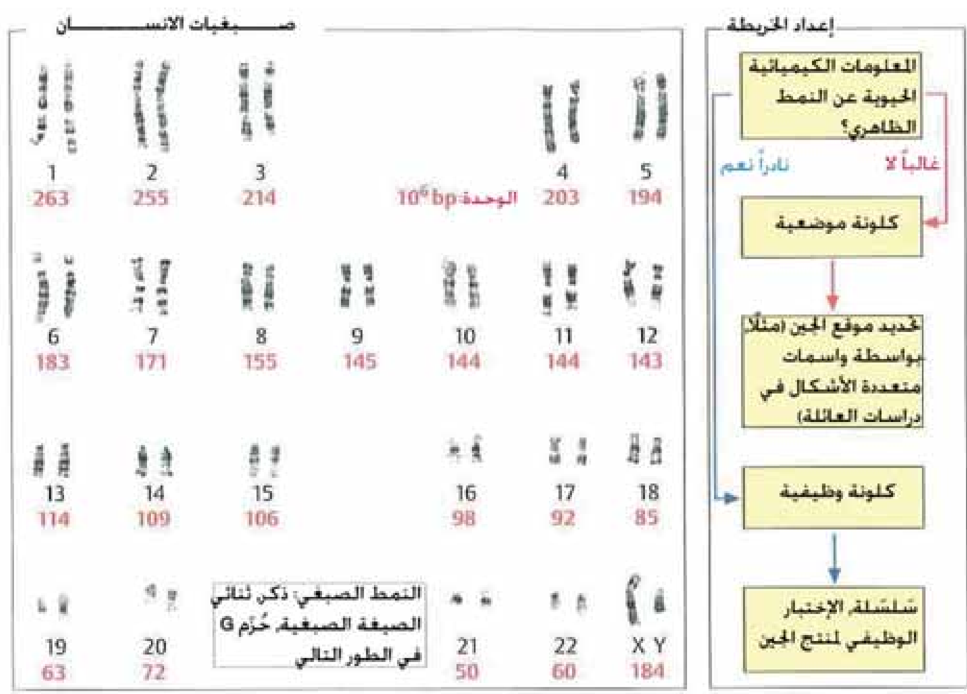
الخرائط الوراثية
الجينات
أجنحة صغيرة m
أعين مضيئة v
أعين واسعة w
جسم أصفر y
الموقع الناتج على الخريطة الوراثية:
y w v m
0 1,3 30,7 33,7
وتيرة التأشيب
بين m و v 3.0%
بين m و y 33.7%
بين v و w 29.4%
بين y و w 1.3%
تسمية الصبغيات
الصبغيات في الطور التالي من إنقسام الخلية بعد تبقيع غيمسا (Giemsa)
الذراع المنطقة الحزمة
مثل 7p15
مثل Xq23
الصبغي 7 لدى الإنسان
الصبغي X لدى الإنسان
ترتيب جينات حقيقيات النوى
توابع الـDNA:
منطقة القسيم المركزي والقسيم الطرفي التوابع الصغيرة (16-64bp) التوابع الدقيقة (2-4bp ، حتى 50 نسخة)
SINE (short interspersed repetitive elements), 100–500 bp (العناصر النووية المنتشرة القصيرة)
LINE (long interspersed repetitive elements), up to 7 000 bp (العناصر النووية المنتشرة الطويلة)
جين
القسيم المركزي
القسيم الطرفي (5'-TTAGGG-3')
بنيات الجين في مختلف الكائنات
أ الإنسان: إكسونات متقطعة، إنترونات عديدة، عناصر متكررة هائلة، عدم وجود مشغلات حيوية (operons)
V28 V29-1 TRY4 TRY5
0 10 20 30 40 50 kB
ب الخميرة (S.cerevisiae): إكسونات مرصوصة للغاية، إنترونات قليلة، عناصر متكررة قليلة
GLK1 SRO9 HIS4 FUS1 AGP1 t Ty2 t BUD3
0 10 20 30 40 50 kB
ج الذرة (Zea mays): تسيطر العناصر المتكرر، لا يوج مشغلات حيوية
Adh1-F
0 10 20 30 40 50 kB
d
د البكتيريا (E.coli): لا يوجد إنترونات، المشغلات الحيوية كثيرة، التسلسلات المتكررة قليلة
thrB thrA thrC dnaK IS186 IS1 carB fixA
0 10 20 30 40 50 kB
جين
إنترون
جين زائف
تسلسل متكرر واسع الجينوم
t= جين مشفرة للـRNA

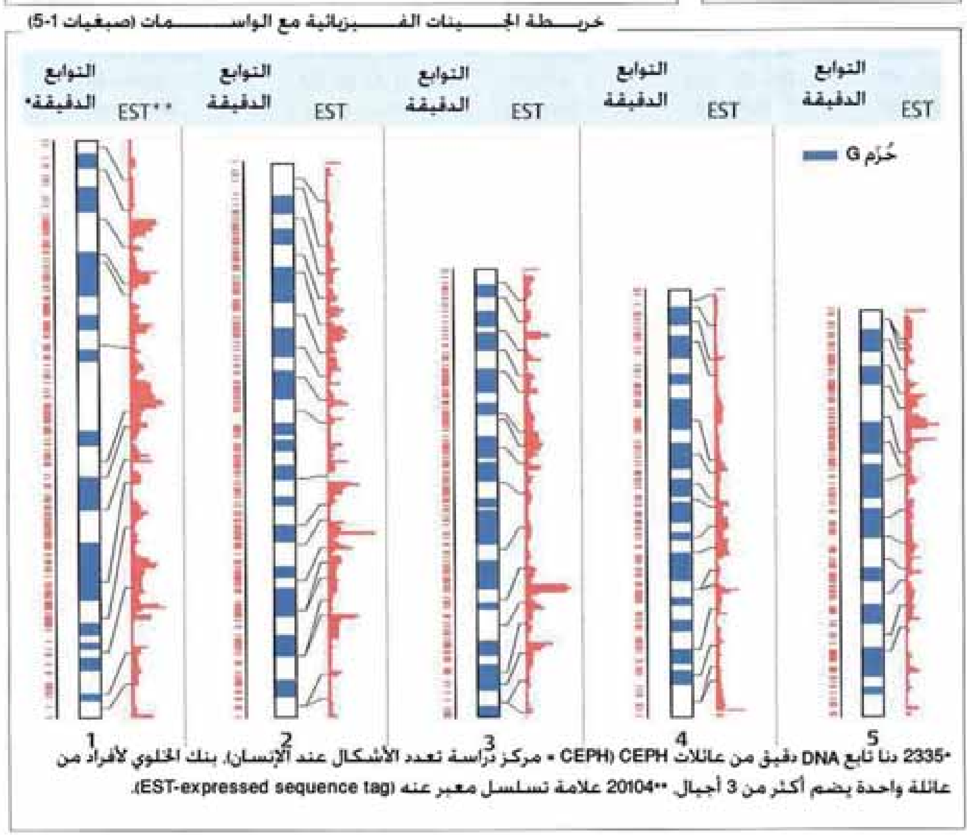
• الجينوم البشري (Human genome)

عموميات (General). باستثناء سَلسَلة الجينوم، فإن التجارب الوراثية على البشر إما غير قانونية أو غير مرغوبة. إلا أنه وبسبب نمط النمو السكاني أي أن 6٪ من البشر **الذين عاشوا** على سطح الكرة الأرضية يعيشون حالياً، فإن مجموعة واسعة من الجينات البشرية هي متوفرة. لقد قاد التحليل الوراثي للتوريث (inheretence) ضمن العائلات، على مدى عقود من الأبحاث، إلى خريطة صبغية (chromosomal map) حيث إنه، حتى قبل ظهور دراسة الجينوم البشري (human genomics)، تم تقدير موقع مئات عديدة من الأمراض الوراثية. مع ذلك، لا يزال تحديد الموقع الدقيق لمرض ما بصيغة سَلسَلة الـ DNA من النادر. يتواجد داخل الجينوم البشري البالغ 3 مليارات (10^9) زوج قاعدي موزعة على 23 صبغياً (مجموعة أحادية الصيغة الصبغية (haploid))، نسبة قليلة فقط من كمية الـ DNA الإجمالي كتسلسلات للمعلومات الوراثية المشفرة للبروتينات، في حين أن معظمه يتألف من عناصر متكررة غير معروفة الوظيفة حتى الآن.

إعداد الخرائط الجينية (Gene mapping). تعتبر الأمراض الوراثية واسمات أنماط ظاهرية (phenotypic markers) مفتاحية عند الإنسان، حيث جرى في بعض الحالات رسم خرائط لبعضها بطرائق الوراثة البشرية (التحاليل العائلية، التحاليل الصبغية، التنسيل الوظيفي والموقعي لجينات مفردة). يحفظ Centre d'Etude du Polymorphism Humain (مركز دراسات تعدد الأشكال البشرية (CEPH))، المؤسَّس عام 1984 في باريس، مزارع نسيجية لمئة عائلة مؤلفة من 3 أجيال، التي تتكون بالمتوسط من 4 أجداد، وأبوين، وثمانية أولاد. إضافة إلى ذلك، تم تقصي مجتمعات قليلة التحركات (مثل، أيسلاند (Iceland)، تزمانيا في أوستراليا (Tasmania)) أملاً بإيجاد ارتباط بين تعدد الأشكال الوراثي (polymorphism) والأنماط الظاهرية (phenotypes) للأمراض الوراثية، والتوصل إلى إنتاج خريطة جينية وظيفية. من أجل تحقيق هذه المساعي تعتبر التوابع الدقيقة (microsatellites) واسمات مفيدة: حيث تتواجد بتواتر عالٍ كما أنها، وبذات الوقت، كثيرة التغيُّر، مشكّلة احتمال (بنسبة 70٪) أن يكون أي فرد متخالف اللواقح (heterologous) لأي تابع دقيق. وبالنتيجة، يمكن تتبع مواقع الجينات المقترنة بالتوابع الدقيقة بشكل مستقل. في عام 1994، تم للمرة الأولى توليد خريطة وراثية للإنسان بواسم واحد لكل 600000bp، جامعة تحاليل 291 انقساماً منصِّفاً (304 أفراد من 20 عائلة من مجموعة CEPH) مع 2335 موقعاً للتوابع الدقيقة. في حين أنه تم حالياً حل هذه الخريطة بواسم واحد لكل 100000bp تقريباً.

سَلسَلة الجينوم البشري (Human genome sequencing). جرى البدء بهذا المشروع الضخم عام 1990 بواسطة اتحاد عالمي ممول حكومياً. لقد اعتمدت استراتيجية هذا المشروع على السَلسَلة المتجاورة (contig sequences) للنسيلات المتداخلة (overlapping clones)؛ بحيث عُلِّمت (tagged) صبغيات مستقلة بواسم مفلور (fluorescent marker)، ثم تمّ فصلها بواسطة جهاز فرز الخلايا المفعَّلة بالفلورة (fluorescence-activated cell sorting (FACS)). بعد ذلك، قطِّعَ DNA هذه الصبغيات ونُقِل إلى 300000 نسيلة BAC؛ وتم حديد النسيلات ذات تسلسلات الـ DNA المتداخلة بواسطة رسم خرائط الحصر (restriction mapping)، والسير على الصبغي (chromosome walking)، والمواقع ذات التسلسل المُعلَّم (site tagged-sequence (STS))؛ كما تم ختام سَلسَلة الـ DNA، بعد القيام بعملية كلونة فرعية (subcloning)، بكلا الاتجاهين (للتخلص من أخطاء السَلسَلة)؛ وفي النهاية، عولج التسلسل بمجمله حاسوبياً باستخدام الخرائط الجينية للتوثيق والتأكيد. هذا الإجراء جرى اتمامه، منذ عام 1996، بسَلسَلة ما يقارب 50000 من علامات التسلسلات المعبر عنها (EST) غير الوافرة. ثم في عام 1998، بدأت شركة Celera الخاصة منافسة المشروع الحكومي، مستخدمة مقاربة القصف (shotgun). فكان حتى ذلك الحين، الـ DNA البشري مقطعاً إلى 60 مليون شدفة بطول 2000bp تقريباً و10 ملايين تسلسل بطول 10000bp، الذين تمّت سلسلتهم بدءاً من كِلا الطرفين مع 500bp في كل مرة (أجريت السَلسَلة للشدف الـ 10000bp للتأكد من أن التسلسلات التكرارية حتى 5kbp لم تُعيَّن خطأً؛ إلا أنه ظهر مؤخراً أن هذه الطريقة ليست خالية من الخطأ). وبهذه المقاربة جرى سَلسَلة ما يقارب 35 بليون زوج قاعدي (bp) من الـ DNA مع وفرة أكبر بـ 12 مرة تقريباً. وفي النهاية، اكتمل المشروعان وتم نشر تسلسل الجينوم البشري في بدايات عام 2001. وعلى نحو مفاجئ وُجد فقط 30000 ـ 40000 إطار قراءة مفتوح (open reading frame (ORF)) يُشفِر لمنتجات جينية أولية. نتنيجة لذلك، توجَّه الاهتمام الآن إلى فهم التنوع الكبير للمنتجات الجينية الأولية في أنواع خلايا مختلفة ـ وهو هدف لبحث دراسة البروتينات (proteomics). وكذلك، أصبحت التنوعات الفردية ضمن تسلسل الجينوم (مثل، تعدد الأشكال بنيوكليوتيد مفرد (single nucleotide polymorphism = SNPs)) وأهمية أشكالها الظاهرية حقلاً هاماً للبحث.





*2335 دنا تابع DNA دقيق من عائلات CEPH (CEPH = مركز دراسة تعدد الأشكال عند الإنسان)، بنك الخلوي لأفراد من عائلة واحدة يضم أكثر من 3 أجيال. **20104 علامة تسلسل معبر عنه (EST-expressed sequence tag).

التحليل الوظيفي للجينوم البشري
(Functional analysis of the human genome)

عموميات (General). يكمن السبب الرئيسي وراء التحليل الوظيفي للجينوم البشري في فهم الأسس الوراثية لأمراض وحيدة (monogenic) أو عديدة المورث ـ الجين ـ (polygenic). من أجل ذلك، تتم محاولة توضيح وتحديد الجين أو الجينات المنخرطة أو المسؤولة عن الحالة المرضية، ومقارنة الانحرافات (تعدد الأشكال (polymorphism)) في التسلسلات لدى الأشخاص المرضى والأصحاء. إذ تنجم بعض الأمراض كمرض التليف المثاني (cystic fibrosis) عن اختلاف بنيكليوتيد واحد (التعدد الشكلي بنيكليوتيد منفرد (single nucleotide polymorphism (SNP))). وبذلك، هذه المقاربة يمكن أن تقود في النهاية إلى 1) تحاليل خطورة وراثية فردية، 2) علاجات انفرادية (دراسة الجينوم لأغراض دوائية (pharamacogenomics))، 3) على المدى البعيد، استبدال الجينات القاصرة (العلاج الجيني)، 4) تحديد البروتينات الهدف البشرية المفيدة في تطوير أدوية جديدة، وأخيراً 5) علم وظائف الجزيئات (molecular physiology) وعلم وظائف الأمراض (pathophysilogy) لدى الإنسان.

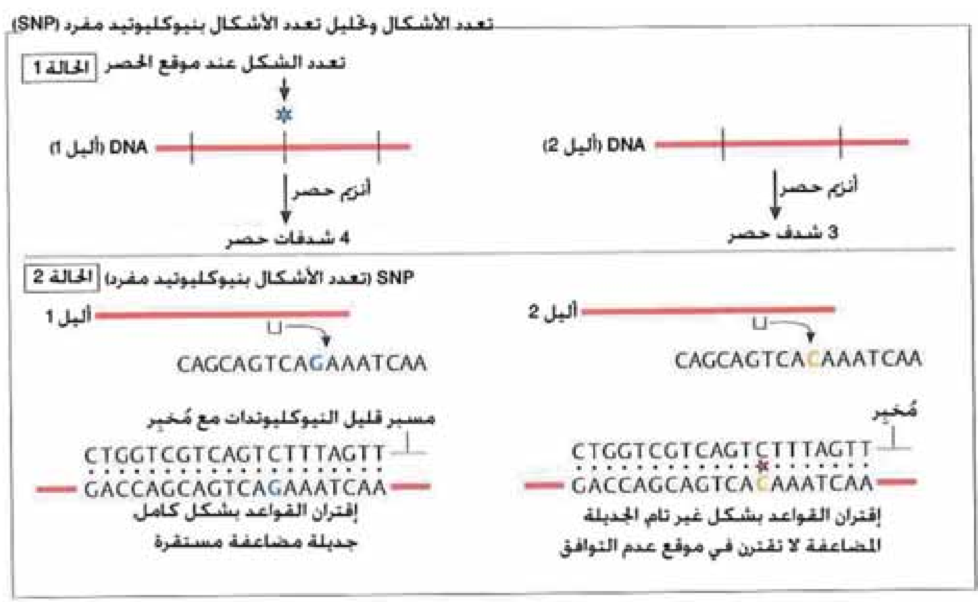
التشخيص الوراثي (Genetic diagnosis). منذ اكتمال سَلسَلة الجينوم البشري وعدد التعددات الشكلية (polymorphism) البشرية المودعة في بنوك بيانات الجينات يتزايد بشكلٍ مطرد (نهاية عام 2002 أكثر من 3 مليون (SNPs. إذ يمتلك كلّ فرد العديد من الاختلافات بنيكليوتيد واحد (SNPs)، والموزعة بنسبة SNP واحد لكل 1000bp أو بمجموع قدره 3 مليون SNP تقريباً في كامل الجينوم. فإذا تموضع الاختلاف بنيكليوتيد واحد ضمن موقع التمييز (recognition site) الخاص بأنزيم الحصر (restriction enzyme)، فإنه يمكن أن يقود تحليل الحصر (restriction analysis) لجزء الـ DNA هذا إلى نمط شدف مختلف (طول شدفة الحصر الناتجة من التعدد الشكلي restriction fragment length polymorphism (RFLP)). تشكل غالبية الـ SNPs والعديد من الـ RFLPs طفرات صامتة (silent mutations)، وقد أثبت أن تلك التي تقع في مناطق التوابع الدقيقة (microsatellites) مفيدة جداً لتحديد النمط الوراثي (genotyping) للأفراد، مثلاً، اختبار الأبوة والتحريات الجنائية. إلا أن ربط التسلسلات الوظيفية للجينات مع الأمراض وحيدة المورث (monogenic diseases) هو أمر صعب للغاية، ولا يزال مستحيلاً بالنسبة إلى الأمراض عديدة المورث (polyenic diseases). لذلك، اقتصرت حتى الآن الاستكشافات الوراثية البشرية على العلوم الأساسية، خاصة فيما يتعلق باقتران الأنماط الظاهرية (phenotypes) خلال التوريث. كما تم تحقيق العديد من الاكتشافات المفيدة باستخدام المقارنة بالجينومات الأخرى. وعليه، تُظهر حتى الكائنات الحية البعيدة عرقياً (phylogenetically) كذبابة الفاكهة، الدودة، السمك والخميرة (*Drosophila*، Caenorhabditis، zebra fish، Saccharomyces) وظائف جينية قريبة من تلك الموجودة عند الإنسان، التي يمكن أن تكون موضوعاً للتجارب الوراثية خلافاً عن الإنسان.

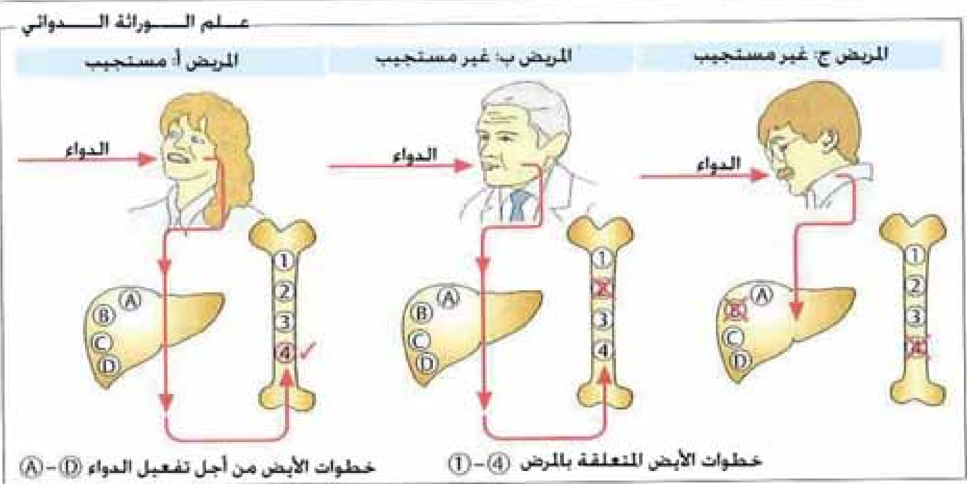
وفي هذا السياق، يعتبر جينوم الفأر، الذي تمت أيضاً سَلسَلته (3.3 بليون زوج قاعدي (bp)) ذا أهمية خاصة، لأن العلاقة الوظائفية - الفيزيولوجية ـ والوراثية بين الإنسان والفأر كبيرة. فالفئران المنقوصة لجين محدد (knockout mice)، التي خضعت لإتلاف جين أو عنصر تنظيمي معين لديها (فأر «الألزهايمر»، فأر العوز المناعي المشترك الشديد sever combined immunodeficiency (SCID) mouse))، تلعب دوراً مفتاحياً في البحث الأوّلي وتطوير المعالجات؛ إذ إن نتائجها تزيد من فرصة التنبؤ، في المستقبل، من بعض تسلسلات الجين الإفرادية، بخطر أن يكون الفرد أو أحد من ذريته سيتطور لديه مرض معين. وبذلك يعتبر تحليل النسخ (transcription) لمجموعات كبيرة من الجينات بواسطة صفيفة الـ DNA (DNA array) وتحريات دراسة البروتينات (proteomic) ذا أهمية كبيرة وخاصة. ولا شك أن هذه التطورات سوف تثير أيضاً العديد من الأسئلة الأخلاقية الجديدة.

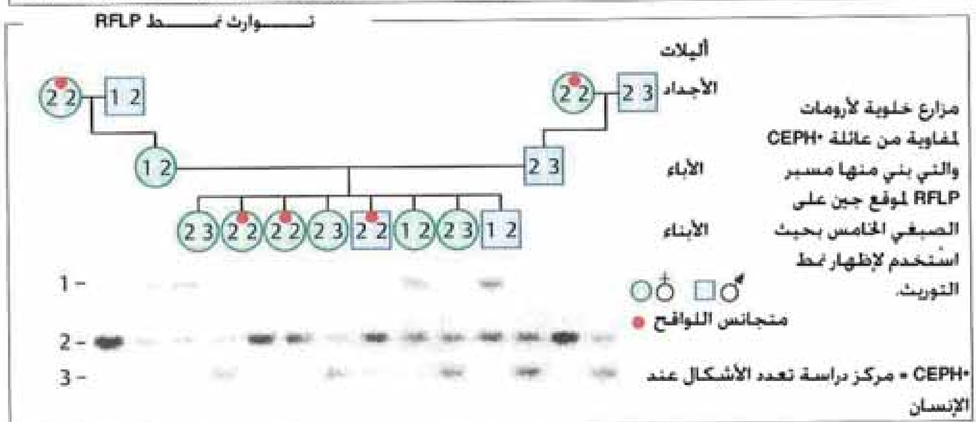
استهدافات تطوير الأدوية (Targets for drug development). عند فهم الأسس الوراثية لمرض ما والبروتينات المسؤولة عن نمطه الظاهري (phenotype)، يمكن إنتاج هذه البروتينات بواسطة الهندسة الوراثية واستخدامها كأهداف في عملية غربلة (screening) عالية الأداء لتطوير الأدوية. إلا أنه، نظراً إلى البنية والتنظيم المعقدين لدى الخلايا وللشروط المحدَّة للديناميكية الدوائية (pharmacodynamics) (إرتشاف الدواء، وتوزعه في الأعضاء، وأيضه (metabolism))، فإن مثل هذه الإجراءات وحيدة السبب، ما تزال بعيدة عن الكمال.

استخدام الجينوم في الصناعات الدوائية (Pharmacogenomics). إن رؤية استخدام الجينوم في الصناعات الدوائية تتجلى في اكتشاف التغيرات في جينوم مريض ما بواسطة تحليل الاختلاف الناجم عن نيكليوتيد واحد (SNP)، وترجمة هذه المعلومات إلى عمليات الأيض الخاصة به الفردي، وانتقاء العقارات المناسبة تماماً للشخص، بكلمات أخرى، تطبيق علاج خاص بكل مريض مع تأثيرات جانبية شبه معدومة. وربما في المستقبل، سيؤخذ بعين الاعتبار التكوين الوراثي الافرادي، بعدما تم تحديده بتحليل النسخ (transcription)، في عملية التسجيل لعقارات جديدة.

العلاج الجيني (Gene therapy). يعتبر الفهم الكامل لبنية ووظيفة الجينوم البشري مطلباً أساسياً من متطلبات العلاج الجيني، أي، الاستبدال الانتقائي لتسلسلات الجينات داخل الجسم.


تعدد الأشكال وتحليل تعدد الأشكال بنيوكليوتيد مفرد (SNP)
الحالة 1
تعدد الشكل عند موقع الحصر
DNA (أليل 1)
DNA (أليل 2)
أنزيم حصر
4 شدفات حصر
3 شدف حصر
الحالة 2
SNP (تعدد الأشكال بنيوكليوتيد مفرد)
أليل 1
أليل 2
CAGCAGTCAGAAATCAA
CAGCAGTCACAAATCAA
مسبر قليل النيوكليوتيدات مع مُخبر
مُخبر
CTGGTCGTCAGTCTTTAGTT
GACCAGCAGTCAGAAATCAA
GACCAGCAGTCACAAATCAA
إقتران القواعد بشكل كامل
جديلة مضاعفة مستقرة
إقتران القواعد بشكل غير تام الجديلة
المضاعفة لا تقترن في موقع عدم التوافق


علم الوراثة الدوائي
المريض أ: مستجيب
المريض ب: غير مستجيب
المريض ج: غير مستجيب
الدواء
خطوات الأيض من أجل تفعيل الدواء Ⓐ–Ⓓ
خطوات الأيض المتعلقة بالمرض ①–④


تـوارث نمـط RFLP
أليلات
الأجداد
الآباء
الأبناء
مزارع خلوية لأرومات لمفاوية من عائلة CEPH• والتي بني منها مسبر RFLP لموقع جين على الصبغي الخامس بحيث استخدم لإظهار نمط التوريث.
متجانس اللواقح
CEPH• = مركز دراسة تعدد الأشكال عند الإنسان

■ التوجهات الحديثة

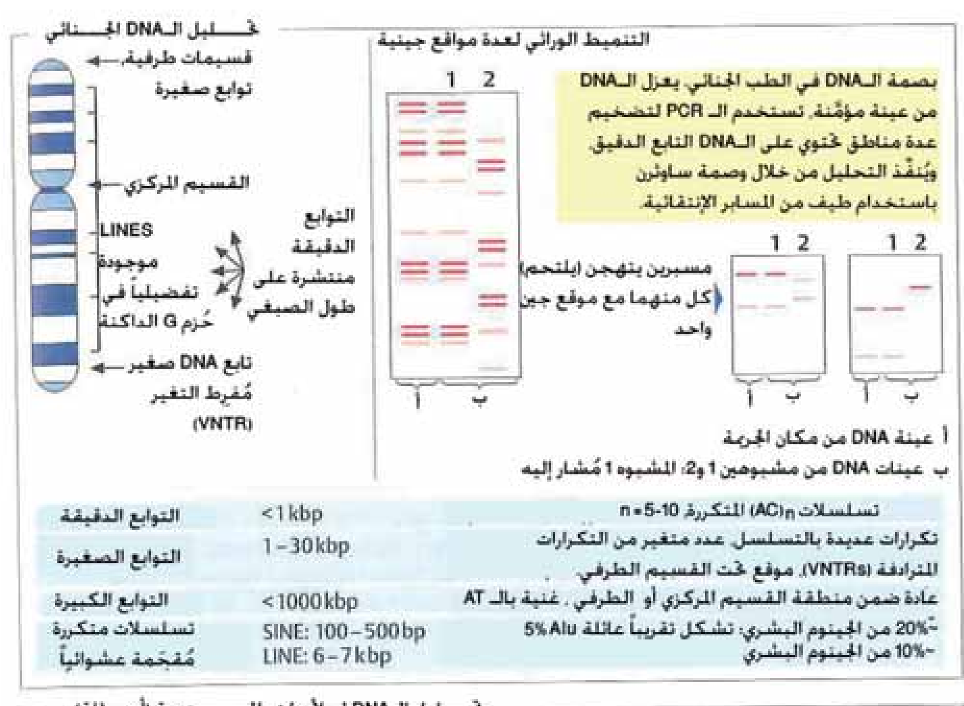
● معايرات الـ DNA (DNA assays)

عموميات (General). يمكن إظهار أحداث التهجين ـ الالتحام ـ (hybridization) التي تحصل بين جديلتين متعددتي النيوكليوتيدات DNA-DNA (polynucleotide strands)، DNA-RNA، أو (RNA-RNA) عبر الربط الهيدروجيني، بتعليم (tagging) أحد هذه الجدائل بعنصر مشع (radioactive)، مفلور (fluorescent) أو بواسم (marker) آخر يمكن الكشف عنه. في العادة، يتم تضخيم الـ DNA المراد تحليله أولاً بواسطة تفاعل البوليمراز التسلسلي (PCR). ولتقليل إمكانية الحصول على نتائج إيجابية خاطئة (false-positive) أو نتائج سلبية خاطئة لأحداث التهجين، فإن البروتوكول الشامل المتبع في تحضير العينة (يمكن أن تتنوع العينة من بول، دم، نسج، مواد النباتية أو مستحاثات (fossils))، واختيار المسبر مفرد الجديلة (single-stranded probe)، وظروف التهجين هي عوامل من الأهمية بمكان. حالياً، تستخدم معايرات الـ DNA في العديد من المجالات، مثل التنميط الوراثي (genotyping) للكائنات المجهرية الممرضة، التحليل الوراثي للأمراض، مراقبة النباتات المعدلة وراثياً أو الأغذية المشتقة منها، وفي اختبارات الأبوة والتحريات الجنائية. يتجاوز حجم سوق معايرات الـ DNA حالياً البليون دولار أمريكي، ومن المُتوقع أن ينمو أكثر مع تقديم اختبارات تشخيصية فردية تعتمد على الـ DNA.

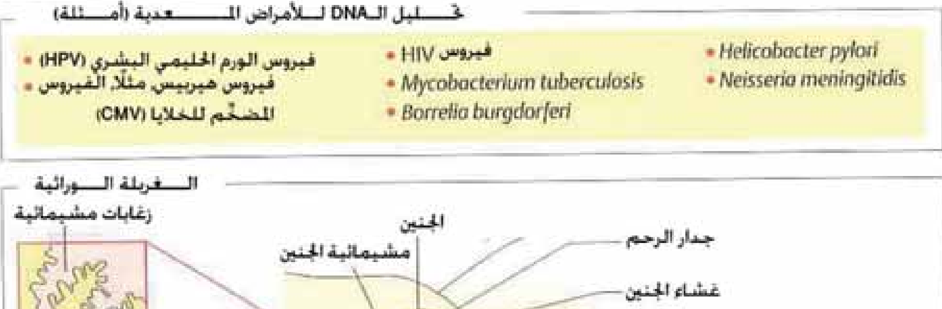
المعدات (Equipments). تضم الإجراءات القياسية (standard) لمعايرات (assays) الـ DNA: 1) الهجرة الكهربائية النسبية على الهلام، 2) معايرات التهجين (hybridization) المعتمدة على المجموعات المُخبِرة البصرية أو الكيميائية كهربائية، 3) صفيفات الـ DNA، (DNA arrays). في الهجرة الكهربائية، يجري تحليل العينة مقارنةً بأحجام قياسية من الـ DNA. بينما في المعايرات المعتمدة على التهجين، يمكن ربط المجموعات المُخبِرة إلى متعدد نيوكليوتيد مفرد الجديلة بواسطة إجراءات كيميائية قياسية، مثل، بيوتين -أفيدين (biotin-avidin)/ روابط ستربتافيدين (streptavidin). أو كبديل، كما هو الحال في معايرة جهاز الدوّار الضوئي (LightCyclers™)، يتم إقحام (insert) الصبغة (SYBR Green™) في الـ DNA المضخم، مما يسمح بقياس أحداث التهجين كمياً في الزمن الحقيقي. وكذلك، تُعتبر معايرة Taq Man™ من الإجراءات الأخرى المفيدة، التي تعتمد على «مرشد جزيئي» (molecular beacon) (الفلوروفور (fluorophore)) مرتبط بنهاية مسبر (probe) الـ DNA. هذا المرشد يكون متآثراً بمادة مطفِئة (quencher) على النهاية الأخرى للمسبر. عندما يتواجد تسلسل متمِّم في عينة ما تخضع للتضخيم في الـ PCR، فإن المسبر يتم تضخيمه، فيتحرر الفلوروفور وتصبح العينة مفلوَرة.

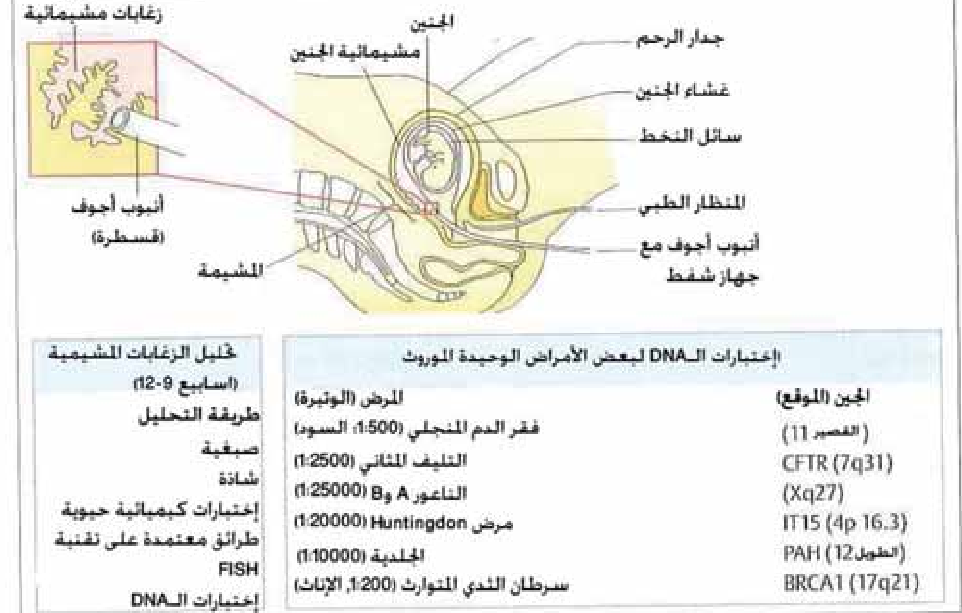
التنميط الوراثي (Genotyping). وهو يستخدم بشكل واسع في الأدلة الجنائية واختبارات الأبوة (البصمة الوراثية (genetic fingerprinting))، كما أنه ينبثق كطريقة قوية في تحليل تعدد الأشكال لدى الإنسان بواسطة نيوكليوتيد مفرد (single nucleotide polymorphisms (SNPs)). في الاختبار الأبوي، تجري مقارنة عدد صغير من تسلسلات التوابع الدقيقة (microsatellite) للذكر بتسلسلات التوابع الدقيقة لنسله المزعوم أو، في التحريات الجنائية، تقارن تسلسلات المشتبه به مع عينة تحتوي على آثار من الـ DNA التي وُجِدت في موقع الجريمة. حيث إن احتمالية مشاركة شخصين نفس نمط التوابع الدقيقة هو ضعيف جداً (باستثناء التوائم المتطابقة). أما تحليل الاختلاف بنيوكليوتيد مفرد (SNP) لمريض ما، فهي تقنية بازغة يمكن أن تستخدَم لتحديد، مثلاً، أمان وفعالية الأدوية على نطاق فردي (بالنسبة إلى كل شخص) (استخدام الجينوم في الصناعات الدوائية (pharmacogenomics)). فمع نهاية عام 2002، تم ادخال أكثر من 3 مليون SNP بشري ضمن قاعدة بيانات الـ SNP الخاصة بالمركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية المؤسَّس في أمريكا (National Center for Biotechnology Information (NCBI)). كما يستخدم أيضاً تحليل الـ SNP في تربية (breeding) النباتات والحيوانات لضمان أصالتها (صحة الأنساب). وفي التشخيص الطبي، تستخدم معايرات (assays) الـ DNA لتحديد تسلسلات الجينات وتشوهاتها وأيضاً في تحديد وجود كائنات معدية في: الدم، أو الشرابات الكحولية أو عيّنات البول. إذ يكفي 11 من الدم كعينة لإظهار وجود العامل الممرض *Plasmodium falciparum*، المسبب للملاريا. وكذلك باستخدام المعايرات المناعية، يمكن تحليل العينات الغذائية لتحديد وجود مستويات قليلة جداً من الكائنات المجهرية الممرضة أو المواد الأولية المعدلة وراثياً. وبما أن تحاليل التنميط الوراثي تبدأ بشكلٍ عام بتضخيم الـ DNA الهدف من العينة، فإن هذه الطريقة تشير إلى ضرورة توفر كمية كافية من المعلومات عن تسلسل الـ DNA هذا من أجل تحضير مسبر مصنع (synthetic probe) يستطيع الالتحام بالـ DNA الهدف.

الغربلة الوراثية لما قبل الولادة (Prenatal genetic screening). تعتبر هذه الغربلة في الوقت الحالي دقيقةً بما يكفي للكشف عن الأمراض الوراثية وحيدة المورث (monogenic) في أجنة الإنسان خلال أسابيع الحمل من 9 ـ 12. يجري عزل الـ DNA من الخلايا الجنينية، التي يمكن الحصول عليها بواسطة أنبوب أجوف ـ القسطرة ـ (catheter) من الزغابة المشيمائية (chorionic villus). لقد بدأ مؤخراً العمل على تأسيس استخدام هذه الطريقة للكشف عن خطر وجود الأمراض الوراثية متعددة ومفردة المورث في مرحلة ما قبل الغرس (تشخيصات ما الغرس (preimplantation diagnostics (PID)) ولكن يلقى ذلك معارضة شرسة بالنظر إلى الأخلاقيات.



التوابع الدقيقة	<1 kbp	تسلسلات $(AC)_n$ المتكررة، n = 5-10
التوابع الصغيرة	1–30 kbp	تكرارات عديدة بالتسلسل. عدد متغير من التكرارات المترادفة (VNTRs). موقع تحت القسيم الطرفي
التوابع الكبيرة	<1000 kbp	عادة ضمن منطقة القسيم المركزي أو الطرفي . غنية بالـ AT
تسلسلات متكررة مُقحَمة عشوائياً	SINE: 100–500 bp LINE: 6–7 kbp	~20% من الجينوم البشري: تشكل تقريباً عائلة 5% Alu ~10% من الجينوم البشري





تحليل الزغابات المشيمية (اسابيع 9-12)

طريقة التحليل
- صبغية
- شاذة
- إختبارات كيميائية حيوية
- طرائق معتمدة على تقنية FISH
- إختبارات الـDNA

إختبارات الـDNA لبعض الأمراض الوحيدة المورث

المرض (الوتيرة)	الجين (الموقع)
فقر الدم المنجلي (1:500، السود)	(القصير 11)
التليف المثاني (1:2500)	CFTR (7q31)
الناعور A وB (1:25000)	(Xq27)
مرض Huntingdon (1:20000)	IT15 (4p 16.3)
الجلدية (1:10000)	PAH (الطويل 12)
سرطان الثدي المتوارث (1:200، الإناث)	BRCA1 (17q21)

• مصفوفات البروتين والـ DNA،

(DNA and protein arrays)

عموميات (General). تسمح مصفوفات الـ DNA الدقيقة على الأسطح الصلبة (رقائق الـ DNA (DNA chips)، رقائق الجينات) أو المصفوفات السائلة بتحديد العديد من أحداث التهجين في آن واحد. تستخدم هذه المصفوفات في عمليات التنميط الوراثي شديدة التوازي، مثل، الكشف عن تعدد الأشكال؛ وفي تحليل التعبير عن الجينات، مثل، دراسة الاختلافات في نسخ الجينات؛ وفي سَلسَلة الـ DNA. تضم مصفوفات الـ DNA الدقيقة المتاحة تجارياً «مرشِّحات الجينات» المصنوعة من النايلون أو النيتروسلولوز، التي تحتوي على مجموعات من شدف الـ DNA المتمم (cDNA) الخاص بالخميرة، أو الفأر، أو الإنسان، أو أي كائن آخر.

التصنيع بالمكان (In-situ synthesis). يعتمد غالباً التصنيع بالمكان على اقتران الفوسفوأميديت، وذلك باستخدام مجموعات حماية نوعية (خاصة) بالنيوكليوتيد يمكن إزالتها بواسطة تفاعلات كيميائية ضوئية. يتم التحكم بتوزيع كل خطوة من خطوات التصنيع على كامل المصفوفة بواسطة تقنيات التصوير الضوئي (أقنعة)، مما يسمح بتحضير مصفوفات تحتوي على 250000 جزيء من قليلات نيوكليوتيد في الـ cm^2. لقد تم حديثاً إنتاج مصفوفة تحتوي على 60 مليون مسبر DNA لتحليل الاختلافات بنيوكليوتيد مفرد (SNP) عند الإنسان على رقاقة واحدة (يصل قطرها إلى 20cm). أما طول قليلات النيوكليوتيد فيُحدَّد عادة بحوالى 25 قاعدة أو أقل، لأن الأخطاء الناجمة عن الاقتران غير الكامل وإزالة الحماية، تتضاعف بكل خطوة من خطوات التصنيع. يؤدي التصنيع العديد لأقنعة التصوير الليثوغرافي المطلوبة في هذه العملية إلى تكاليف إنتاج مرتفعة لصنع الرقاقة الأولية، ولكن في نفس الوقت إلى تكاليف منخفضة في الإنتاج التجاري.

الإيداع الدقيق (Microdeposition). عوضاً عن تصنيع الـ DNA بالمكان، يمكن إيداع أي طول من الـ DNA أو الـ DNA المتمم (cDNA) مفرد الجديلة، أو من قليلات النيوكليوتيد بشكل دقيق على سطح مثل الزجاج. كما يمكن استخدام طرائق الكيمياء السطحية القياسية من أجل خطوة الاقتران. يتم إيداع قليلات النيوكليوتيد إما بواسطة التبقيع بالملامسة بواسطة دبابيس أو بالتبقيع غير الملامس وذلك بالقطرات، اعتماداً على طرائق الضغط الكهربائي ـ بيازو ـ (تقانة طابعة نفاثة الحبر (inkjet)). ويمكن لأجهزة وضع البقع الدقيقة التجارية أن تصل إلى سرعات تفوق 10000 قطعة DNA أو cDNA بالساعة. لقد سمحت مثل هذه التقنية بتصنيع مصفوفات تحتوي على 10000 قليل نيوكليوتيدي بكل cm^2. تعتبر مصفوفات قليلات النيوكليوتيد مفيدة في الكشف عن التهجين غير الكامل والناجم عن عدم التطابق (مثلاً، تحليل الـ SNP). كما تعتبر إعادة سَلسَلة الـ DNA تطبيقياً آخر؛ حيث يجب أن تكون المصفوفة محتوية على كامل التسلسل مفرد الجديلة للـ DNA الهدف على شكل قطع متداخلة فيما بينها. لقد تم تقييم هذا الإجراء بواسطة سَلسَلة DNA الميتوكندريا عند الإنسان (mtDNA) باستخدام مصفوفة تحتوي على 16000 جزيء من قليلات النيوكليوتيد يتكون كل جزيء منها من 20 قاعدة؛ التي تم الكشف فيها عن 179 من أصل 180 متعدد شكل جيني معروف، بتجربة تهجين واحدة.

التحري أو الكشف (Detection). يجري الكشف عن التهجين ـ الالتحام ـ من خلال الوسم بمجموعات مُخبِرة مشعة أو مولدة للفلورة، مقترنة بالعادة بمسبر من الـ DNA أثناء التضخيم. أما إجراء الكشف فيُنَفَّذ بواسطة التصوير الشعاعي الذاتي، أو ماسحات الليزر الضوئية، أو محلِّلات الصور المُلتقَطة بالأجهزة المقترنة بالشحنات (CCD). من جهة أخرى، وبغية الكشف عن حدوث التهجين ولكن من دون استخدام الواسمات، يمكن فصل كتل المنتجات الناتجة من الامتداد (النوعي البادىء) للمسبر وتحليلها باستخدام مطياف الكتلة MALDI-TOF[21].

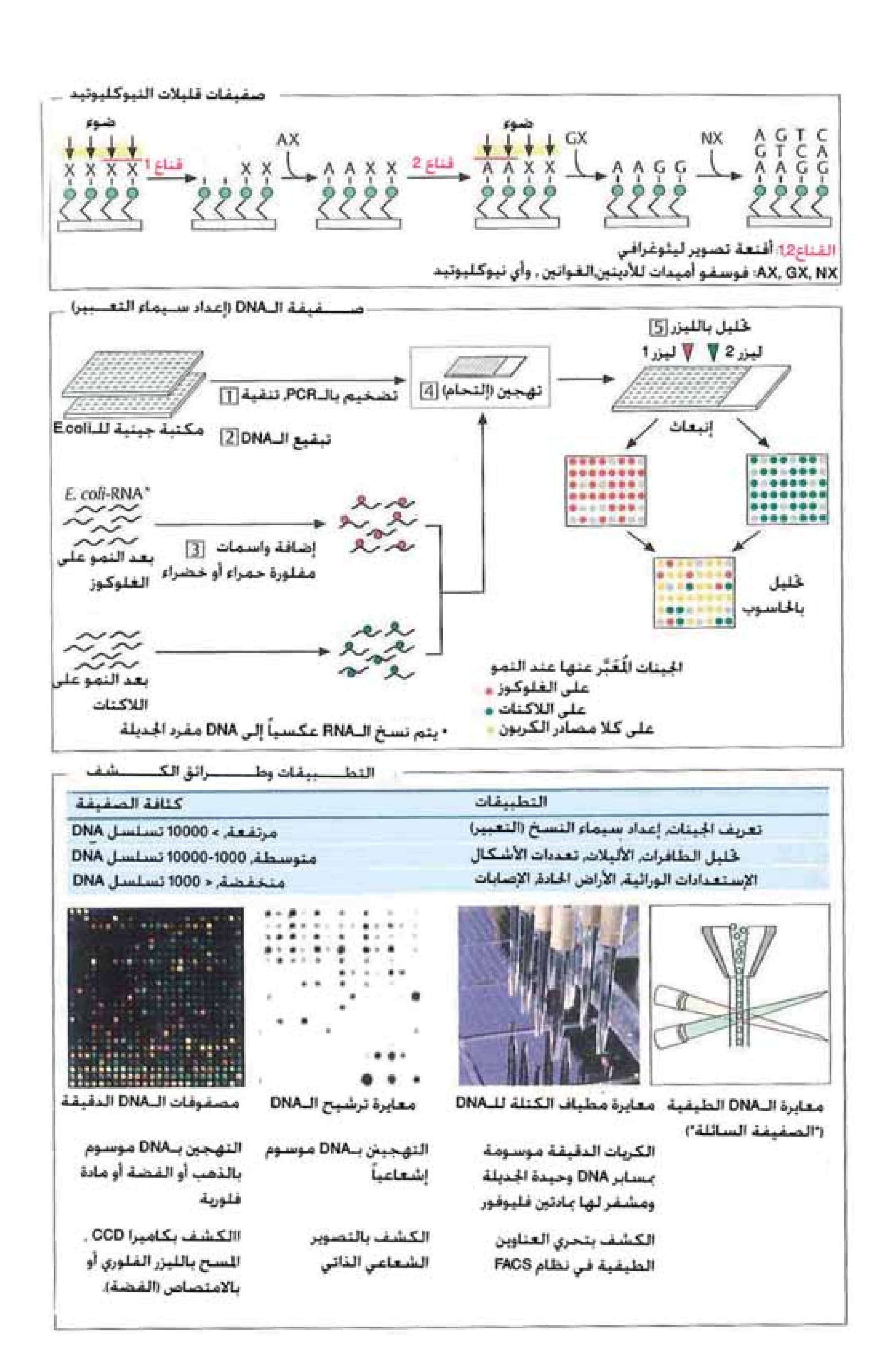
«المصفوفات السائلة» (Liquid array). ويجرى فيها وسم كرات بوليسترين دقيقة مُعَلَّمة بـ DNA مفرد الجديلة بشكل متباين بمادتي فليوروفور، مما يسمح بالفرز السريع لـ100 تسلسل DNA مختلف، وذلك اعتماداً على عناوينهم الطيفية في جهاز فرز الخلايا المُفَعَّلة بالفلورسين (FACS).

مصفوفات البروتين (Protein arrays). يمكن إيداع عدد كبير من البروتينات، عوضاً عن الـ DNA، على سطح زجاجي. على سبيل المثال، يمكن اختبار البروتينات المستهدفة من قبل الكيناز إذا تم تثبيت جميع البروتينات المُفترض بأن تكون مستهدفة على مصفوفة واحدة، ثم الإتاحة لتفاعل الفسفرة المُحَفَّز بالكيناز بأن يأخذ مجراه من خلال تأمين الـ ATP الذي يكون موسوماً بالفوسفور المشع ^{32}P، ليتم بعدها إجراء التصوير الشعاعي الذاتي وقراءة النتيجة.

---

(21) matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry MALDI-TOF-MS

ويتم بهذه الطريقة إطلاق الليزر على بقعة ويقوم النسيج الغشائي بامتصاص الطاقة، التي يتم نقلها بعد ذلك إلى المحلل، مما يؤدي إلى تأيين الجزيء MALDI، ثم تُسرَّع هذه الأيونات بواسطة مجال كهربائي (زمن الطيران) TOF



التطبيقات	كثافة الصفيفة
تعريف الجينات، إعداد سيماء النسخ (التعبير)	مرتفعة، > 10000 تسلسل DNA
تحليل الطافرات، الأليلات، تعددات الأشكال	متوسطة، 1000-10000 تسلسل DNA
الإستعدادات الوراثية، الأراض الحادة، الإصابات	منخفضة، < 1000 تسلسل DNA

• المجموعات المُخبِرة (Reporter groups)

عموميات (General). تلعب الجزيئات المُخبِرة دوراً هاماً في كل من الأبحاث الأساسية والتطبيقية. وهي تُستخدم 1) في التحليل الكيميائي الخلوي للخلايا والتحليل الكيميائي النسيجي للأنسجة، 2) من أجل فرز الخلايا في جهاز الفرز، 3) لإظهار أحداث الارتباط، مثل، الأجسام المضادة، أو المستقبلات أو الـ DNA، و4) في العديد من الإجراءات المستخدمة في الهندسة الوراثية (مثلاً، في الكلونة أو تحري ودراسة المحضضات). تضم الجزيئات والذرات المُخبِرة المستخدمة على نحوٍ متكرر النظائر المشعة، والمواد المفلوَرة ـ فليوروفور ـ، والأنزيمات. ومن أجل ربط هذه المُخبِرات بالبروتينات أو الـ DNA، يستخدم غالباً نظامي البيوتين ـ ستربتافيدين والديجوكسيجينين. أما المُخبِرات المستخدمة كثيراً في الهندسة الوراثية فتضم الجينات المشفرة لأنزيم بيتا غالاكتوزيداز، اللوسيفيراز، والـ GFP (البروتين المفلوَر الأخضر).

الواسمات المشعة (Radioactive markers). في المعايرات المناعية الإشعاعية (RIA)، يتم وسم المتفاعلات بـ ^{131}I أو ^{35}S، ويقاس النشاط الإشعاعي بعدّاد الومضات. بينما في تجارب الوراثة الجزيئية، غالباً ما يتم استخدام الفوسفات الموسوم ^{32}P وإقحامه ضمن جزيء الـ DNA أو الـ RNA باستخدام أنزيم بوليمراز الـ DNA، I (DNA)، شدفة كلينو، أو أنزيم بوليمراز الـ RNA. بعد ذلك يمكن استخدام الـ DNA أو الـ RNA الموسوم إشعاعياً للكشف عن أحداث التهجين (hybridization) بالتصوير الشعاعي الذاتي أو، بشكل أسرع، بواسطة مُصَوِّر الفوسفور. لا تزال تستخدم هذه الطرائق في العديد من المختبرات، على الرغم من إجراءات وأنظمة الأمان الإشعاعي الصارمة والمنافسة من قبل إجراءات وطرائق أسرع، وذلك لامتيازها بالحساسية العالية.

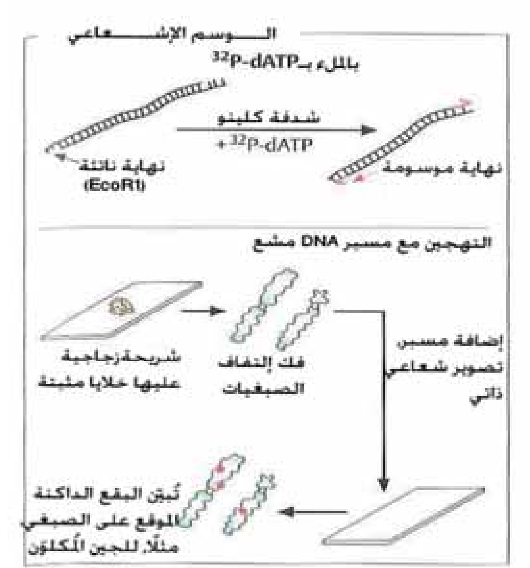
المواد المفلوَرة ـ الفلوروفور ـ (Fluorophores). تعتبر المواد المفلورة كالفلورسين أو الرودامين جزيئات مُخبِرة عالية الحساسية حتى مستوى البيكومولار (pM). تستخدم الأجسام المضادة الموسومة بالمادة المفلورة في التحريات الكيميائية النسيجية والكيميائية الخلوية. فباستخدام فارز الخلايا المُفَعَّلة بالفلورسين (FACS)، تسمح هذه المواد بفصل الخلايا الموسومة عن غير الموسومة بسرعة 1000 خلية بالدقيقة أو ما يزيد. يستخدم هذا الإجراء في علم الأحياء الخلوية، مثلاً، في فصل الخلايا البائية B عن الخلايا التائية T بعد وسم مستضدات محددة معروضة على سطح هذه الخلايا، وكذلك في فصل مزارع خليطة من البكتريا بعد وسم التسلسلات ذات المجموعة التصنيفية النوعية بالـ RNA الريبوزومي 16S عن طريق التهجين (التهجين في الموقع المُفَلْوَر. وتجدر الإشارة إلى أن صبغة SYBR Green وبروميد الإيثيديوم من المواد المفلورة المُخبِرة عن الـ DNA.

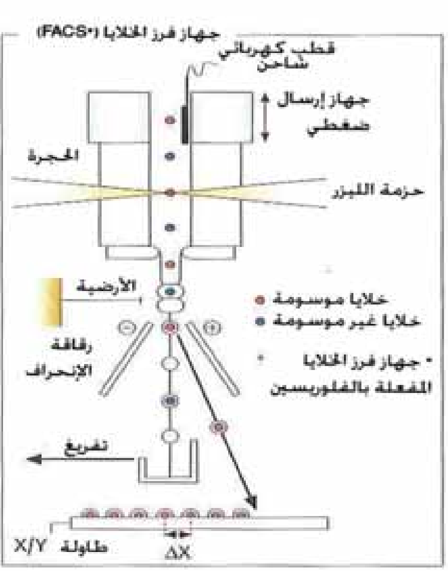
الأنزيمات (Enzymes). مقارنةً بالجزيئات المُخبِرة المذكورة حتى الآن، تمتلك الأنزيمات ميزة تحسين وتعزيز حساسية التحليل بشكلٍ إضافي وذلك بتضخيم الإشارة. وتعتبر هذه الميزة هامة وذاتَ فائدة كبيرة، خصوصاً في التقديرات التحليلية الكمية. من الأنزيمات المُخبِرة المستخدمة بكثرة نذكر أنزيمي الفوسفتاز القلوي وبيروكسيداز الجرجار؛ حيث يمكن قياس تفاعلات هذين الأنزيمين بالمستشعرات الحيوية، أو بالكيمياء الكهربائية، أو بالقياس الضوئي. وإذا ما استخدمت المعايرات الأنزيمية التي تقيس الفلورة أو تقيس اللمعان الكيميائي، فإن حساسية الكشف يمكن أن تصل إلى البيكومولار أو حتى الأتومولار.

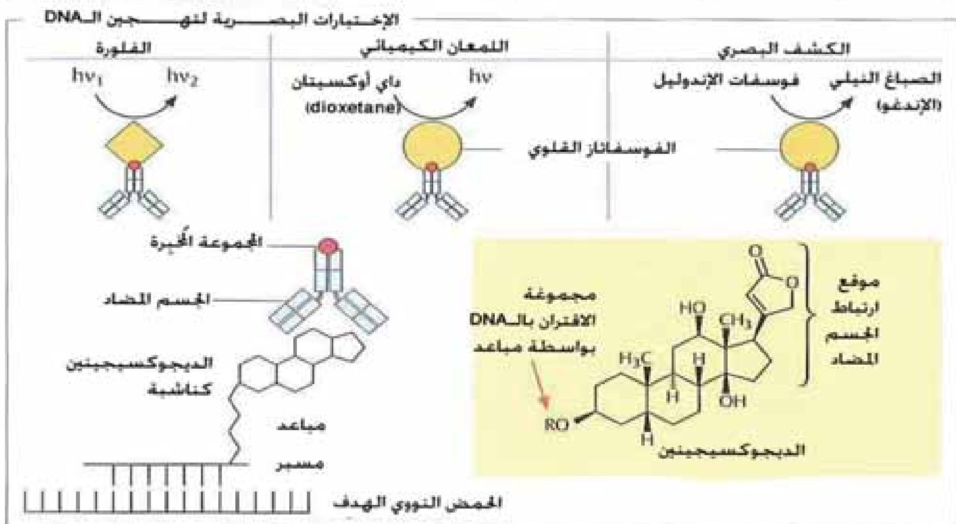
الديجوكسيجينين والبيوتين ـ ستربتافيدين (Digoxigenin and biotin-streptavidin). تستخدم هذه المواد الكيميائية غالباً لقرن الجزيء المُخبِر مع الجزيء الحيوي المراد تحليله. الديجوكسيجينين (تبلغ كتلته المولية (M_R) 390,52) هو مركب ستيروئيدي قابل للاقتران بالنيوكليوتيد بواسطة مجموعة الهيدروكسيل بدون التأثير في أحداث التهجين. كما يمكنه الارتباط بألفة عالية ($10^{-9}M$) بالجسم المضاد المحدد الذي يمكن وسمه بعدة أصناف من الجزيئات المُخبِرة. وعلى نحوٍ شبيه، هناك أيضاً نظام البيوتين ـ ستربتافيدين (ذو ألفة تبلغ $10^{-10}M$).

المُعلمات الوراثية (Genetic Markers). يساعد إقحام جينات مُشفِرة لبروتينات مُخبِرة على التحليل السريع لأحداث الكلونة. على سبيل المثال، تعتمد الغربلة الـ «بيضاء ـ زرقاء» على تسلسل الـ DNA المتولِّد من بلازميد والمشفِر لشدفة من أنزيم البيتا ـ غالاكتوزيداز. في حالة إدخال الـ DNA الغريب ضمن هذه الشدفة، فإنها لا تعود متتامة مع الـ DNA الصبغي المُشفِر للجزء المتبقي من هذا الأنزيم.

وعليه لن يتم تحليل المركب الأولي المُلوِّن X-gal، (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) (chromogenic substrate) المضاف للوسط إلى صبغة زرقاء. أما الواسم الوراثي المفيد الآخر فهو البروتين ذي الفلورة الخضراء (GFP)، الذي تمّت كلونة الجين المشفِر له من قنديل البحر، وهو يُبدي فلورة قوية من دون إضافة أي مادة. لذلك، يمكن استخدام هذا الجين كمُخبِر لدراسة وظيفة المحضض، أو التعبير الجيني، أو التنظيم الجيني. وكذلك أيضاً، تستخدم جينات اللوسيفيراز المكلونة من حشرات اليراع أو البكتريا الضوئية لذات الهدف، لكن إظهار البروتينات المُخبِرة المعبّر عنها يتطلب إضافة مركب أولي أو على التوالي).







الجينات المُخبِرة المستخدمة عادةً		
الجين	المركب الأولي المضاف من الخارج	الكشف
Lac Z': شدفة جين من الـβ-غلاكتوزيداز	5-برومو-4-كلورو-3-إندوليل-β-D-غلاكتوبيرانوزيد (X-Gal)	مرئي (أزرق-أبيض)
Lux: اللوسيفيراز من اليراعة البكتيريا الضوئية	اللوسيفيرين أو الديكانال	لمعاني
GFP: بروتين فلوري أخضر من قنديل البحر	–	فلوري

• التصميم البروتيني (Protein design)

عموميات (General). يشير التصميم البروتيني أو هندسة البروتينات إلى التعديلات في تسلسلات البروتين باستخدام الطرائق الوراثية. تستخدم تقنيات الهندسة البروتينية من أجل 1) فهم الآليات الأنزيمية، 2) تعديل الأنزيم أو مواقع الارتباط في الجسم المضاد حسب الرغبة، و3) تعديل خصائص الأنزيم الشاملة، مثل ثباتيته على حرارة مرتفعة، وعند درجات متطرفة للرقم الهيدروجيني (pH)، وتجاه أنزيمات البروتياز (proteases)، بالإضافة إلى خصائص انحلاليته واستمناعه. وإذا ما استخدمت بنية بروتين معروف كنقطة بداية، وجرى استبدال أحماض أمينية مفردة أو تسلسلات باستخدام التطفير الموجه في الموقع (site-directed mutagenesis)، فيعرف مثل هذا البروتكول بالتصميم البروتيني المنطقي. بينما يعرف التبديل الوراثي لأحماض أمينية عشوائياً ثم انتقاء المناسب منها من خلال صفاتها المحسنة باسم التطور الموجه (directed evolution).

الطرائق العامة (General methods). يتطلب كلا إجرائي التصميم البروتيني المنطقي والتطور الموجه توفر الجين المُشفِر للبروتين. وبالنسبة إلى التصميم البروتيني المنطقي، تعتبر المعلومات البنيوية عن البروتين لازمة أيضاً؛ بحيث يمكن استنباطها من البنية التي تعطيها الأشعة السينية (x-ray)، ومن معطيات جهاز الرنين المغناطيسي النووي (NMR) البنيوية، ومن النموذج البنائي المشتق من البنيات الثلاثية لبروتينات قريبة جداً بواسطة محاكاة المجانَسة.

التطفير (Mutagenesis). يجري في التصميم البروتيني المنطقي استبدال أحماض أمينية مفردة، أو إدخال (insertion) أو إلغاء (deletion) تسلسل حمض أميني معين. هذه التعديلات تتم عادة على مستوى الـ DNA بواسطة تفاعل البوليمراز التسلسلي (PCR)، كما أن هناك عدة بروتوكولات متوفرة تمكّن من تنفيذها بإجراءات بسيطة، سريعة وموثوقة. ففي التطفير العشوائي، يمكن كلونة الجين في مضيف من بكتريا *E. coli* التي خضعت لإضعاف آليات إصلاح الـ DNA لديها والمزروعة تحت ظروف مطفِّرة. أو، وكبديل عن ذلك، استخدام بروتكول الـ PCR الذي يؤدي إلى تشكل عدد كبير من الأخطاء الاصطناعية خلال عملية تضخيم الـ DNA (1 ـ 3٪)، وذلك بإضافة أيونات المنغنيز Mn^{+2} أو وسائل أخرى. كما يعتبر الخلط الجيني طريقة أخرى في هذا المجال، تعتمد على مفهوم إنشاء مكتبة من شدف الـ DNA لجينات متقاربة (يجب أن تكون نسبة تماثل تسلسلاتها 80٪ كحد أدنى) ثم تأشيبها بواسطة طرائق الـ PCR، متبوعةً بغربلة فائقة الأداء للصفات المرغوبة.

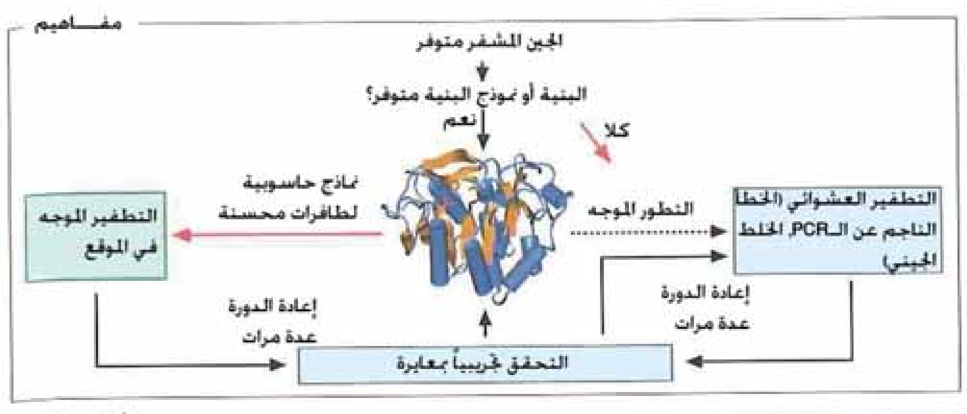
التصميم البروتيني المنطقي (Rational protein design). عادة ما يتم الحصول على البنية الثلاثية للبروتين بالتصوير البلوري بالأشعة السينية (x-ray crystallography)، وأحياناً أيضاً بواسطة تقنيات الرنين المغناطيسي النووي ثلاثي الأبعاد (3D NMR) من البروتينات الموسومة بعنصري N^{15} وC^{13}. كما وتتوفر عالمياً (عن طريق الإنترنت) في قواعد بيانات البروتينات البنيات البروتينية لأكثر من 18000 نظير.

وبذلك، يمكن في حالة إبداء البروتين ذي الأهمية تشابهاً تسلسلياً بنسبة أعلى من 30٪ مع بروتين آخر توافرت نظائره، تأمين النموذج البنائي للبروتين المبهم بدقة كافية لتجارب التطفير؛ وذلك باستخدام محاكاة المجانَسة (homology modeling) للبنية المبهمة بالاعتماد على النظائر المعروفة. حتى وقت قريب، كانت مثل هذه المحاكاة ممكنة فقط ضمن التفريغ، بسبب محدودية قوة الحواسِب. ولكن مع ظهور الحواسِب الخارقة والحواسِب عالية التوازي، فإن نمذجة بنيات البروتينات، والبروتينات الطافرة، وارتباطهم بالمركبات الأولية (substrates) أو المستضدات (antigens) أصبحت ممكنة في المذيب (ربما يتطلب هذا بعض الحسابات الميكانيكية الجزيئية (حسابات القوى الأرضية) لتآثر عدة عشرات الآلاف من الذرات). وعلى الرغم من التقدم الكبير، فإنه يجب عادة أمثلة هذه التوقعات المشتقة من طرائق in-silico[(22)] بعدة دورات من المحاكاة والتجارب الوراثية (دورات الهندسة البروتينية).

التطور الموجه (Directed evolution). على العكس من التصميم البروتيني المنطقي، إن النماذج البنيوية غير ضرورية في هذه التقنية. فبالنسبة إلى أمثلة أنزيم ما، يُعرَّض الجين المشفِر إلى التطفير العشوائي، ثم يعبَّر عن الجينات العديدة الطافرة الناتجة في مكتبة طافرة (mutant library)، لتُحلَّل في النهاية بالمعايرات (assays) الأنزيمية بحثاً عن الصفات المرغوبة. لقد أبدت تقنية العرض بالعاثية (phage display) كفاءة عالية في عملية أمثلة انتقائية الارتباط لدى الأجسام المضادة وذلك لإتاحتها غربلة مكتبات ضخمة من الأجسام المضادة الطافرة (حتى 10^{10}). كما أنه في حالة الأنزيمات، تكون نوعية المعايرة الأنزيمية هامة جداً فهي التي تحدد سرعة الحصول على الأشكال الطافرة ونوعيتها. في السنوات الأخيرة، ساهمت هذه الطريقة (التطور الموجه) في تحقيق نتائج ممتازة في مجال تحسين الأنزيمات الصناعية، مثلاً، في تعديل نوعيتها بالمركب الأولي (substrate-specificity) أو استقرارها الحراري أو القلوي. إن نظم الروبوتات أو الـ FACS (أجهزة فرز الخلايا المفعلة المنسابة flow-activated cell sorters) هي المستخدمة بشكلٍ عام في هذه الطرائق.

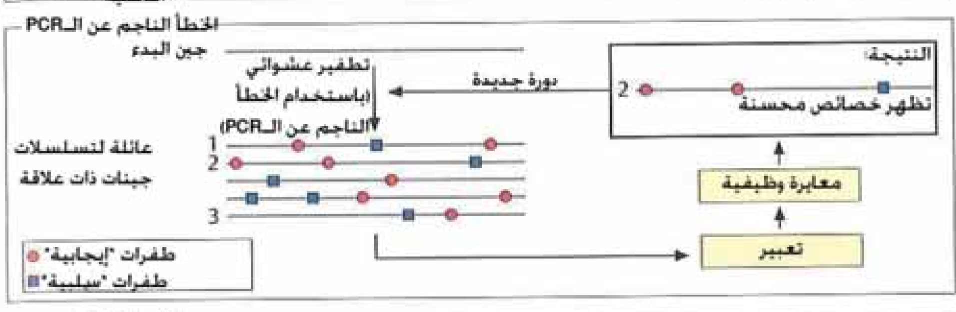
---

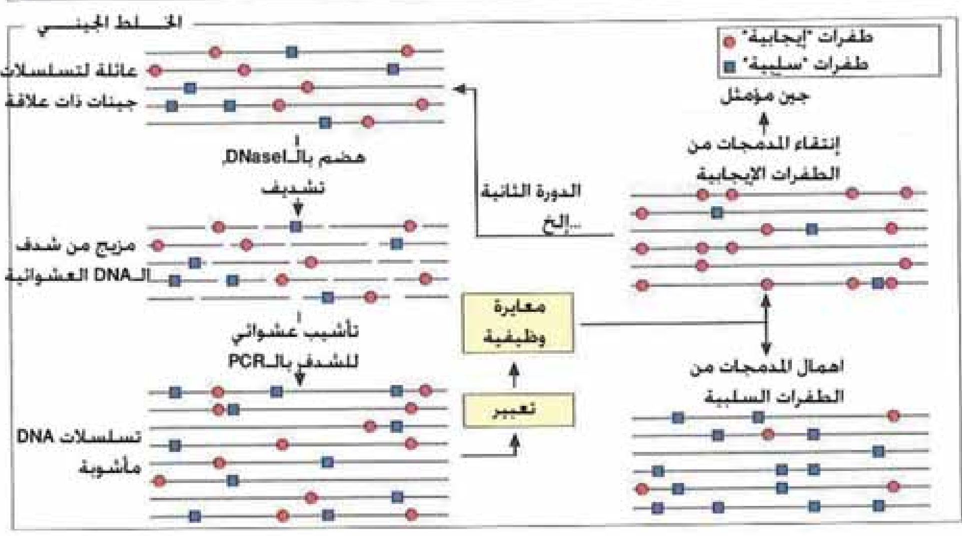
(22) In-silico: محاكاة الجزيئات والتفاعلات والعمليات الخلوية باستخدام أجهزة الكمبيوتر.



أمثـــلة

التأثير	الطفرة	الطريقة	الأنزيمات
أثباتية تجاه الأكسدة	^{222}met → ala	التصميم المنطقي	بروتياز المنظفات
تحطم أبطئ	^{22}lys → pro	التصميم المنطقي	لإنسولين البشري
تحطم أبطئ	حذف الكرنغل 2	التصميم المنطقي	مفعل البلازمينوجين النسيجي (htPA)
إنحلالية أفضل بالمذيب	في خمسة مواقع	التطور الموجه	أسيلاز البنسيلين
تعديل كبير في النوعية بالمركب الأولي	في أربعة مواقع	التطور الموجه	السيتوكروم P450 هيدروكسيلاز الأحماض الدهنية





العلاج الجيني (Gene therapy)

عموميات (General). من ضمن 15000 مرض تقريباً مسجل عند الإنسان، هناك أكثر من 90٪ غير ممكن الشفاء منه بالمعالجة التقليدية؛ إذ إن معظم هذه الأمراض هو ناشئ إما بالتوريث أو بسبب خلل وراثي مكتسب. وبذلك، يتمحور العلاج الجيني حول إمكانية استبدال الجينات الحاصل فيها خلل وظيفي بجينات سليمة. مع نهاية عام 2002، استُخدم بشكل أساسي في الولايات المتحدة الأمريكية ما يفوق عن 600 بروتوكول علاج جيني لمعالجة أكثر من 3500 مريض. بشكل عام، يعتبر العلاج الجيني الموجه نحو خلايا الإنسان الجسمية مقبولاً، ولكنه غير مقبول ومُعطَّل عندما يتضمن نقلاً للجينات إلى الحيوانات المنوية (sperm cells) أو إلى البويضات (egg cells) عند الإنسان (الخلايا الجنسية)، التي يمكن أن تقود إلى صفات توريثية جديدة في نسل المستقبل. من المهم بمكان، التمييز بين العلاج الجيني خارج الجسم في بيئة اصطناعية (ex vivo) حيث يتم إكثار الخلايا البشرية وتحويلها خارج الجسم البشري قبل إعادتها من جديد، والمعالجة الجينية داخل الجسم (in vivo) التي تتضمن معالجة مباشرة للمرضى بالمادة وراثية.

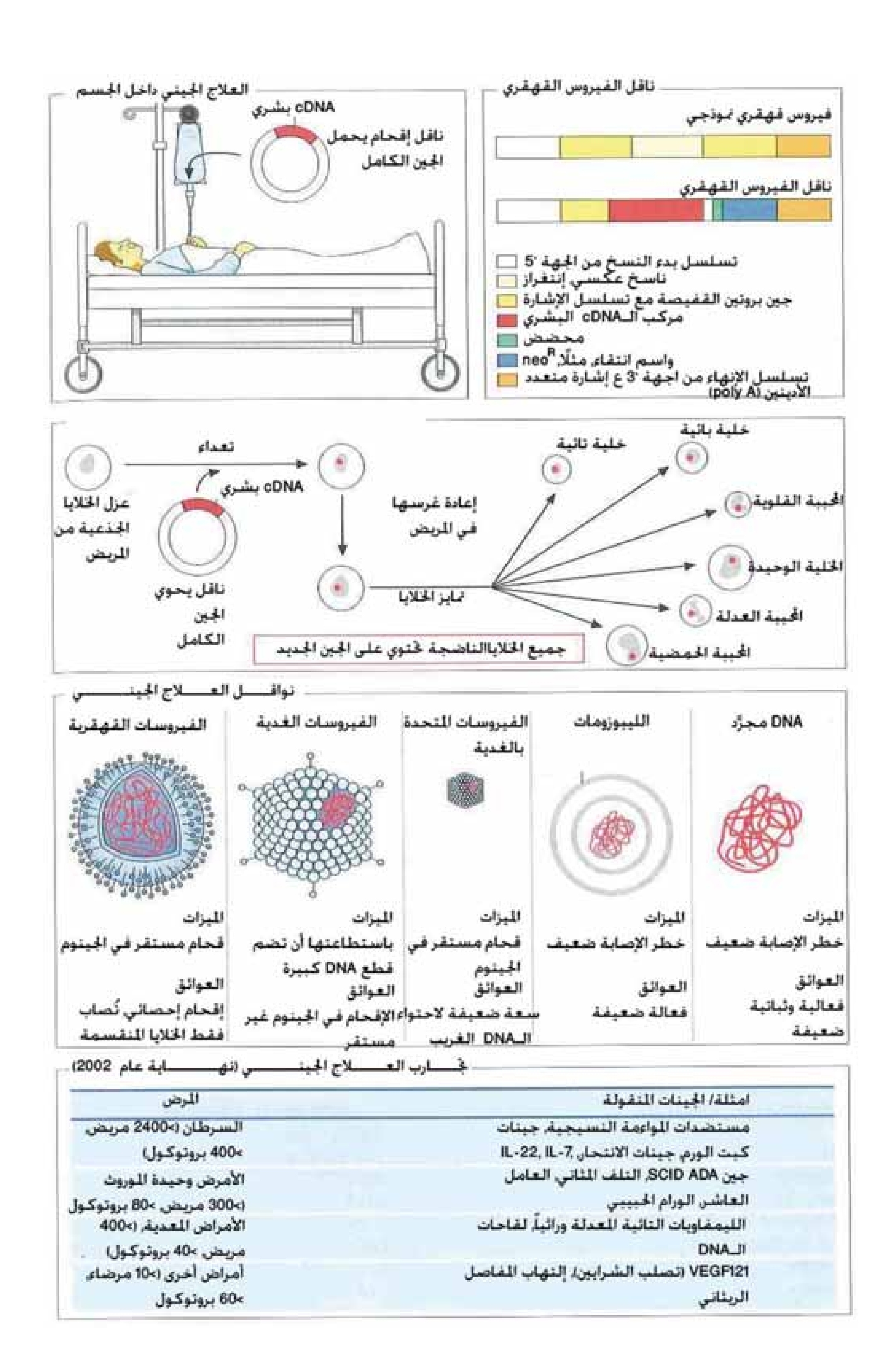
مفاهيم عامة (General concepts). لا تزال الأسس الوراثية لأغلب الأمراض مجهولة بشكل كبير. ولكن حتى العلاج الجيني لأمراض وحيدة المورث ـ الجين ـ المعروفة السبب الوراثي يواجه صعوبات كبيرة: حيث يجب التغلب على الحواجز الحيوية المناعية للجسم وآليات الضبط الخلوي الموجهة ضد الأحماض النووية الغريبة. حالياً، تركز التجارب العلمية على 1) تأشيب (recombination) تسلسلات الجينات القاصرة مع التسلسل الصحيح المضاف من الـ DNA المتمم (cDNA)، 2) إسكات الجينات بواسطة الـ RNA المضاد للتعبير أو الـ RNA المتدخل، و3) إصلاح (repair) تسلسلات الـ DNA القاصرة بخليط (chimeras) الـ DNA-RNA. تضم النواقل المفضلة في مثل هذه الإجراءات: الفيروسات القهقرية (تشكل حوالى 35٪ من مجمل البروتوكولات)، والفيروسات الغدية (حوالى 27٪)، والليبوزومات الكاتيونية ـ إيجابية الشحنة ـ من خلال الحقن الدهني (حوالى 12٪). تسمح الليبوزومات الدهنية بنقل قطع أكبر من الـ DNA المتمم؛ في حين أن الفراغ المتاح لمقحمات (inserts) الـ DNA الغريبة ضمن القفيصة الفيروسية صغير ـ يتراوح بين 4kbp (للفيروسات غدية) و30kbp (فيروس القوباء). هذه الليبوزومات الدهنية يمكن استخدامها كبخّاخ عبر الجهاز التنفسي، لتصل إلى الخلايا عن طريق الالتقام الخلوي. بينما تحقن عادةً النواقل الفيروسية، تحت الجلد، أو داخل العضل أو في الورم مباشرةً. إضافة إلى ذلك، لقد تم أيضاً وصف نقل النخاع العظمي من المريض بعد إجراء تعديلات على الـ DNA (المعالجة بالخلايا المستمدة ذاتياً) وكذلك التطبيق المباشر للـ DNA.

البروتوكولات الفردية (Individual protocols). يركز حوالى 3/ 2 من إجمالي بروتوكولات العلاج الجيني على معالجة الأورام. ولهذه الغاية، تتم إدارة الجينات الكابحة للورم، مثل، BRCA1 أو P53، أو جينات السايتوكين، مثل، IL-2، أو المستضد الموائم نسيجياً، مثل، HLA-B7، أو ما يعرف بجين الانتحار. إن البروتوكولات المستخدمة في معالجة الأمراض وحيدة المورث تهتم في أغلب الأحيان بالعوز المناعي المرتبط الحاد عند الإنسان (severe combined immunodeficiency (SCID))، الناجم عن قصور الجين المشفر لأنزيم الأدينوزين دي أميناز (adenosine deaminase (ADA)). كما ويعتبر العلاج الجيني للأمراض المعدية (التلقيح بـ DNA مجرّد) مجالاً آخر للأبحاث.

النقل الجيني خارج الجسم (Gene transfer ex vivo). يعتمد هذا النوع من النقل على بروتوكولات تم تأسيسها بنجاح لازدراع النخاع العظمي. ويتمثل النوع الخلوي المفضل في مثل هذا الإجراء بالخلية الجذعية المكوِّنة للدم، وهي الخلية السالفة لجميع الخلايا في الدم والجهاز المناعي. من حيث المبدأ، إذا كان من الممكن استبدال العوز (القصور) الوراثي في هذه الخلايا التي لا تزال غير متمايزة خارج الجسم من خلال النقل الجيني، فإن هذه الخلايا المحورة يجب أن تتمايز إلى خلايا دم ومناعة «سليمة»، بعد نقلها إلى المانح. إلا أنه في الوقت الحالي، تعتبر زراعة الخلايا الجذعية البالغة غير المتمايزة شديدة الصعوبة، كما يشكل استخدام الخلايا الجذعية الجنينية لهذا الغرض مسألة مثيرة للجدل.

النقل الجيني داخل الجسم (Gene transfer in vivo). نجح هذا النوع من النقل الذي يهدف إلى استبدال الجينات القاصرة عن طريق تعداء المريض بنواقل (vectors)، أو ليبوزومات أو DNA، في تحويل جزء من الخلايا المستهدفة على الأقل. كما أنه في بعض الحالات، جرى تحسن في الحالة الصحية للمريض بشكل ملموس؛ فعلى سبيل المثال، عاد أربعة مرضى مراهقين من أصل خمسة يعانون العوز المناعي المرتبط الحاد X1، (SCID-X1) كانوا قد تلقوا العلاج الجيني، للعيش مع ذويهم بشكل طبيعي. إلا أنه لا يزال التعداء الانتقائي لنوع الخلايا المقدر سلفاً مشكلة كبيرة.

الاستنتاج (Conclusion). على الرغم من أن العلاج الجيني للأمراض وحيدة السبب عند الإنسان هو أمر ممكن من حيث المبدأ، إلا أن هناك العديد من المشاكل التي لم تُحل بعد. وقد أدى موت أحد مرضى العلاج الجيني بالولايات المتحدة، بسبب التكاثر غير المضبوط لفيروس الغدة المستخدم كناقل، إلى زيادة إجراءات الأمان والسلامة المستخدمة خلال المعالجة أكثر.



المرض	امثلة/ الجينات المنقولة
السرطان (>2400 مريض >400 بروتوكول)	مستضدات المواءمة النسيجية، جينات كبت الورم جينات الانتحار IL-7, IL-22,
الأمرض وحيدة المورث (>300 مريض، >80 بروتوكول	جين ADA SCID، التلف المثاني العامل العاشر الورام الحبيبي
الأمراض المعدية، (>400 مريض، >40 بروتوكول)	اللمفاويات التائية المعدلة وراثياً لقاحات الـDNA
أمراض أخرى (>10 مرضاء >60 بروتوكول	VEGF121 (تصلب الشرايين، إلتهاب المفاصل الريثاني

• دراسة البروتيوم (Proteomics)

عموميات (General) . تمّت صياغة مصطلح البروتيوم (proteome) عام 1995، الذي يصف مجموع البروتينات المشفر لها في الجينوم.

طرائق (Methods) . يكمن جوهر بحث دراسة البروتيوم (proteomics) في فصل وتعريف عدد كبير من البروتينات. فعلى سبيل المثال، يحتوي بروتيوم بكتريا *E. coli* على ما يقارب 4000 بروتين. إن تحضير العينة هو أمر هام ويتطلب إجراءات لعزل بروتينات الغشاء تختلف عن تلك المتبعة لعزل بروتينات السيتوبلازم. في حقيقيات النوى، تستخدم بشكل مفضل خلاصات بروتينية لأنواع خلوية فردية حيث تقدم معلومات عن التعبير التفاضلي (التمايزي). تتجلى الطريقة الأكثر أهمية من أجل فصل البروتينات في الهجرة الكهربائية ثنائية الأبعاد على هلام البولي أكريلاميد (2D PAGE) . في هذه الطريقة، تجري عملية الفصل في البعد الأول على أساس نقطة التعادل الكهربائي للبروتين، أما في البعد الثاني فعلى أساس الكتلة المولية. كما يمكن تحسين التبيان عن طريق التحكم بتحدر (gradient) درجات الرقم الهيدروجيني (pH) . يجري التحليل شبه الكمي لهلامات 2D PAGE عن طريق التبقيع (الفضي)، ثم الغربلة، وبعد ذلك التحليل الحاسوبي. وتسمح الأنظمة عالية الأداء بتحليل ما يعادل 100 هلامة أسبوعياً. إلا أن تحديد البروتينات نادرة الوجود (10 ـ 1000 نسخة/ خلية)، وعلاقة البروتينات المعدلة بعد ترجمتها مع البروتين السالف، والقياس الكمي هي من أهم المعوقات. هناك طريقة يمكن استخدامها من أجل تحقيق التحليل الكمي، وهي استخدام مكتبات من الأجسام المضادة المأشوبة، لكن ذلك يتطلب معرفة هوية البروتينات المدروسة. في هذه الحالة، إذا كانت كمية البروتين المعبّر عنه أكبر من 1g، فإنه يمكن تحديد تسلسل النهاية الأمينية (N) لهذا البروتين بشرط أن لا تكون النهاية الأمينية مؤستلة ـ مضاف عليها مجموعة أسيتيل ـ (acylated)؛ وبذلك يمكن مطابقة هذا التسلسل مع بيانات حاسوبية. وبالنسبة إلى تعريف البروتينات المعبر عنها بشكل أقل، فإن قياس الكتلة الطيفي هو الطريقة المختارة؛ إذ يمكن باستخدام مطياف الكتلة MALDI-TOF[23] الحصول على الكتل الجزيئية التقريبية، أو كبديل عن ذلك، يمكن هضم البروتينات بالهلامة بواسطة أنزيم التربسين (trypsin) ما يفضي إلى مزيج من الببتيدات التي يتم تحليل كتلها أيضاً بواسطة مطياف الكتلة MALDI-TOF، ثم لدى مقارنتها بنموذج حاسوبي لبروتينات تم هضمها بأنزيم التربسين فإن ذلك سوف يقدم معلومات عن هوية البروتين المدروس. ولكن، يمكن استخدام هذا الإجراء فقط عند توفر تسلسل الجينوم وعندما يتم تحديد جميع البروتينات بجيناتها. إذا لم يكن ذلك متوفراً، فعندئذٍ يمكن الاستعانة بمطياف زمن الطيران ذي التأين بالإرذاذ الإلكتروني Electrospray ionization-time of flight (ESI-TOF)) لتحديد أنماط تشذف البروتين المجهول، وبذلك الحصول على معلّمات تسلسل بروتينية protein sequence tags (PST))، التي بدورها غالباً ما تكون متوافقة مع مُدخَلات موجودة في قواعد بيانات البروتين. تبلغ حساسية كلتا الطريقتين عدة فيمتومولات ($fetomole = fmoles = 10^{-15}mole$) لكل بقعة بروتينية. إلا أنه للوصول إلى هذه الحساسية، يجب التعبير عن عدة مئات من الآلاف من نسخ هذا البروتين في الخلية.

التطبيقات (Applications) . باستخدام دراسات البروتيوم (proteomics) يمكن تحليل التغييرات المُحَرَّضة أو النوعية خلوياً الموجودة في النمط البروتيني المعبر عنه لخلية ما. والأمثلة على ذلك: 1) الاختلافات في نمط التعبير عن بروتيوم بكتريا *E. coli* بعد نموها على الغلوكوز أو اللاكتات كمصدر كربوني، 2) مقارنة أنماط البروتينات لخلايا البنكرياس من شخص سليم بأخر مصاب بالسكري، 3) دراسات السمّيّة لأنماط بروتينات معدلة في الكبد بعد المعالجة بالأدوية.

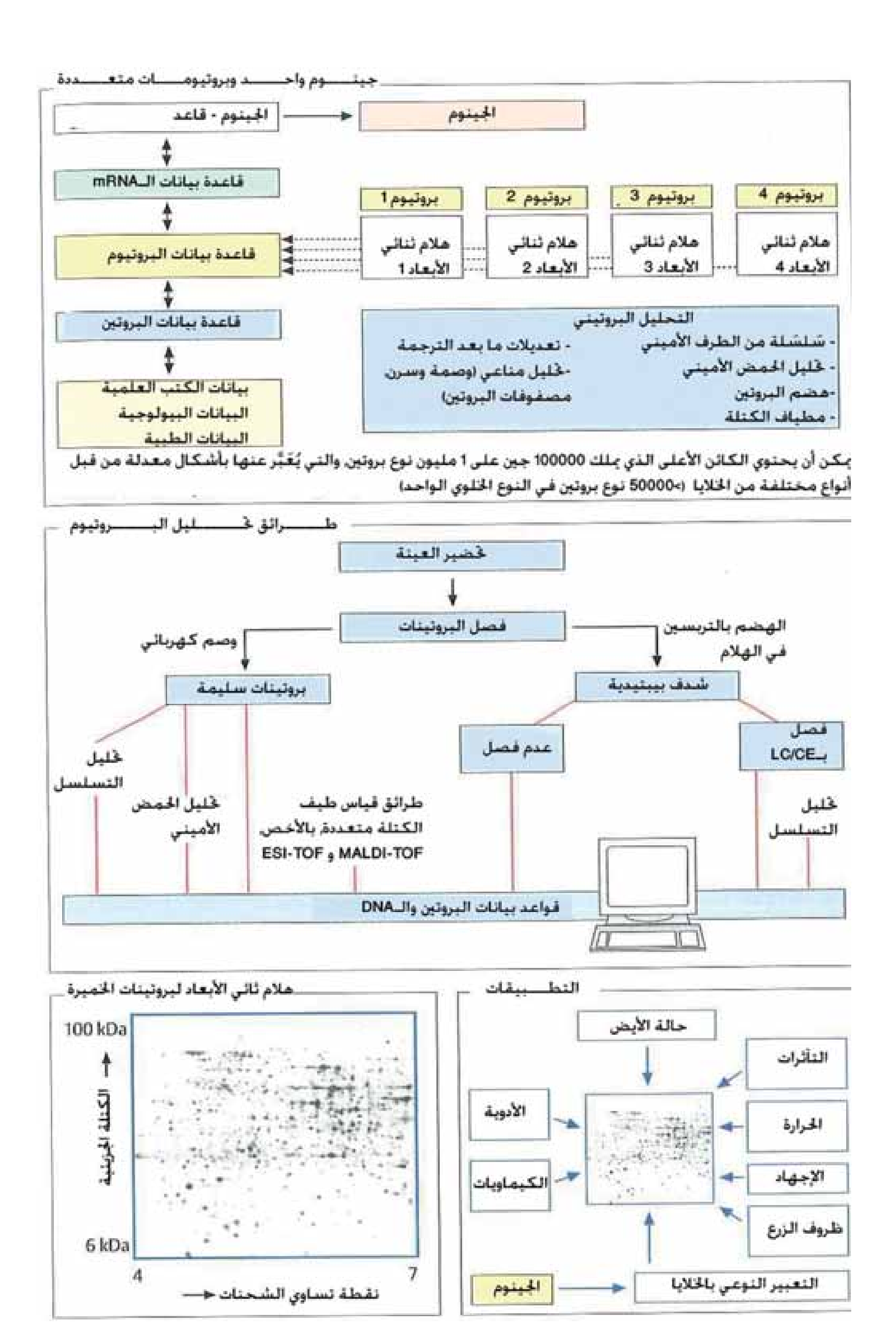
وهكذا، في غالب الأحيان، تم تحديد البروتينات الواسمة لأمراض محددة. إضافة إلى ذلك، تساعد دراسات البروتيوم على تحديد وظائف البروتينات في الخلية. ولتحقيق هذا، يحاول العلماء بناء خريطة للبروتيوم خاصة بالنوع الخلوي الذي تتم دراسته، وفهم التآثر البروتيني في هذا «المعمل الخلوي». تعتبر طريقة إدخال مُعلِّمات الهستيدين his tags) وراثياً من الطرائق المفيدة لذلك، حيث يمكن استخدام هذا المُعلِّم من أجل تنقية البروتين المعبّر عنه والبروتينات المترافقة من خلال التنقية بالألفة وتحديد هوياتهم بواسطة مطياف الكتلة.

الدراسات التمهيدية لبروتيوم الإنسان (Human proteomics initiative) . تتضمن قاعدة بيانات SWISS-PROT حالياً (منتصف 2002)، 8300 تسلسل مشروح لبروتينات الإنسان. وتترافق هذه المدخلات مع ما يقارب 21900 مرجع، و21200 تعديل من تعديلات ما بعد الترجمة ـ تجريبية أو متوقعة، و2340 شكلاً من أشكال عمليات القطع والوصل، و13450 من تعدد الأشكال (polymorphism) (غالبيتها مرتبطة بحالات مرضية).

---

(23) matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry MALDI-TOF-MS.

ويتم بهذه الطريقة إطلاق الليزر على بقعة ويقوم النسيج الغشائي بامتصاص الطاقة، التي يتم نقلها بعد ذلك إلى المحلل، مما يؤدي إلى تأيين الجزيء MALDI، ثم تسرع هذه الأيونات بواسطة مجال كهربائي (زمن الطيران) TOF.


جينوم واحد وبروتيومات متعددة
الجينوم - قاعد
الجينوم
قاعدة بيانات الـmRNA
بروتيوم 1
بروتيوم 2
بروتيوم 3
بروتيوم 4
هلام ثنائي الأبعاد 1
هلام ثنائي الأبعاد 2
هلام ثنائي الأبعاد 3
هلام ثنائي الأبعاد 4
قاعدة بيانات البروتيوم
قاعدة بيانات البروتين
التحليل البروتيني
- سلسلة من الطرف الأميني
- تحليل الحمض الأميني
- هضم البروتين
- مطياف الكتلة
- تعديلات ما بعد الترجمة
- تحليل مناعي (وصمة وسرن مصفوفات البروتين)
بيانات الكتب العلمية
البيانات البيولوجية
البيانات الطبية
يمكن أن يحتوي الكائن الأعلى الذي يملك 100000 جين على 1 مليون نوع بروتين، والتي يُعَبَّر عنها بأشكال معدلة من قبل أنواع مختلفة من الخلايا (<50000 نوع بروتين في النوع الخلوي الواحد)
طرائق تحليل البروتيوم
تحضير العينة
فصل البروتينات
وصم كهربائي
الهضم بالتربسين في الهلام
بروتينات سليمة
شدف ببتيدية
عدم فصل
فصل بـLC/CE
تحليل التسلسل
تحليل الحمض الأميني
طرائق قياس طيف الكتلة متعددة بالأخص MALDI-TOF و ESI-TOF
تحليل التسلسل
قواعد بيانات البروتين والـDNA
هلام ثنائي الأبعاد لبروتينات الخميرة
100 kDa
الكتلة الجزيئية
6 kDa
4
7
نقطة تساوي الشحنات
التطبيقات
حالة الأيض
التأثرات
الأدوية
الحرارة
الكيماويات
الإجهاد
ظروف الزرع
الجينوم
التعبير النوعي بالخلايا

غربلة الأدوية (Drug screening)

عموميات (General). جرى تقليدياً البحث عن أدوية جديدة ومركبات كيميائية زراعية بطرائق التجربة والخطأ. ومع التطورات الحديثة في مجال علوم الحياة والمفاهيم التقنية للهندسة الوراثية تم استبدال هذه الطرائق بمقاربات أكثر عقلانية. تعتمد هذه المقاربات على المقدمة المنطقية بأن الأدوية تعمل على هدف واحد أو عدة أهداف داخل الكائن البشري، كالأنزيمات، أو المستقبلات (receptors)، أو القنوات الأيونية (ion channels). كما يمكن أن تكون أيضاً أهداف المواد الزراعية بروتينات نباتية ذات أهمية في التمثيل الضوئي (photosynthesis). وكنتيجة للتطورات في مجالي دراسة الجينوم (genomics) والبروتيوم (proteomics)، أصبحت وظائف هذه الأهداف مفهومة أكثر. يمكن تحضير كميات كافية من هذه الأهداف بواسطة تقنية التأشيب (recombinant technology)، كما يمكن استكشاف تآثرها مع مركبات طبيعية أو مصنعة تجريبياً. إضافةً إلى ذلك، يمكن أيضاً تعديل البنيات الأساسية التي تم الحصول عليها من هذه المقاربات بالتصنيع الكيميائي وذلك باستخدام مقاربات كيميائية إندماجية، وبالتالي الحصول على أدوية أو مركبات كيميائية زراعية جديدة، عالية الكفاءة وحسب الرغبة.

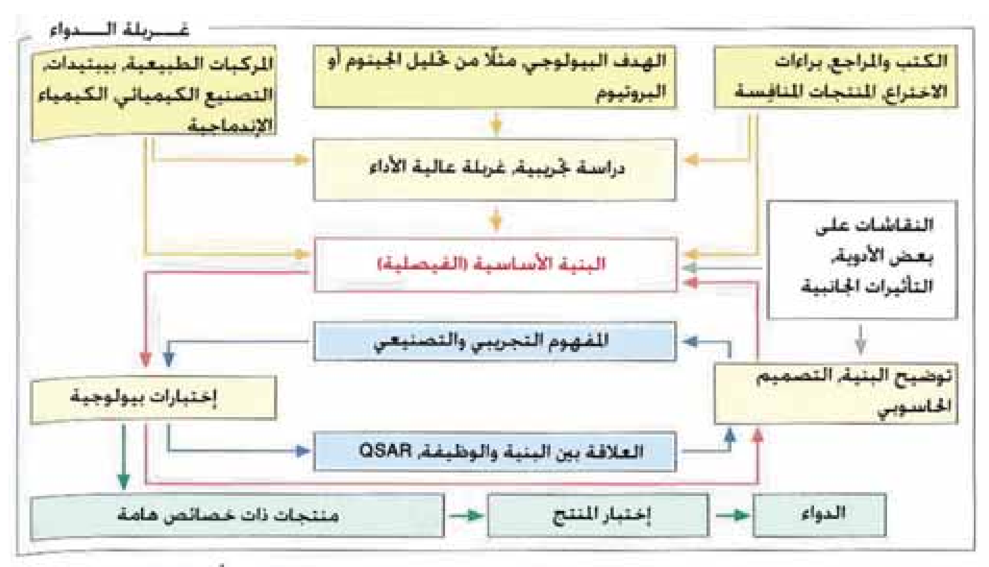
تعريف وتحضير الأهداف (Identification and preparation of targets). لا يزال تحديد هوية الأهداف صعباً، خصوصاً بالنسبة إلى الأمراض متعددة المورثات (multigenic diseases) (الحالة العامة). مؤخراً، جرى إحراز تقدم ملحوظ في هذا المجال عن طريق ربط دراسات أنماط التوريث، على سبيل المثال، في المجتمعات المعزولة وراثياً مثل تلك التي في أيسلاندا أو تسمانيا، مع تعدد الاشكال الناجم عن نيوكليوتيد مفرد (single nucleotide polymorphism (SNP))، أو مع أليل ما، أو مع تحليل البروتينات لدى مرضى يعانون مرضاً ما. وعند إيجاد أن أنزيماً ما أو قناة أيونية أو مستقبِل هو السبب المحتمل لمرض ما، فإنه يتم استخدام التجارب على الحيوانات لإثبات هذه النظرية عن طريق إنقاص جين محدد (knockout) أو استخدام الـ RNA المتدخل (RNAi). فإذا قادت المقاربة المتبعة إلى تأكيد الهدف، فعندئذٍ من الممكن استخدام هذا الهدف في معايرة عالية الأداء للبحث عن (الغربلة) أدوية جديدة. على سبيل المثال، إذا عُرِّف المستقبِل المقترن ببروتين G، (G-coupled receptor) كهدف، فإنه يجري التعبير عنه في أغشية خلايا الأرومة الليفية (fibroblast) للفأر، مصحوباً بالتعبير عن اللوسيفراز (luciferase) المأخوذ من حشرة اليراعة (firefly) كأنزيم مُخبِر في سيتوبلازم الخلايا. وبذلك، ستَرْفَعُ عند ارتباط رابط (liband) ما بهذا المستقبل، الإشارةُ المنقولة عبر عناصر مستجيبة لـ cAMP (أدينوزين حلقي أحادي الفوسفات cyclic adenosine monophosphate) مستوى الـ cAMP داخل الخلايا. وبالتالي، يمكن عند إضافة اللوسيفرين (المادة التي يعمل عليها أنزيم لوسيفراز) إلى هذه الخلايا، إجراء التقدير الكمي لارتباط الرابط باستخدام فعالية اللوسيفراز التي تعتمد على كمية الـ cAMP.

الغربلة العالية الأداء (High-throughput screening). يستلزم النظام الواسع الانتشار في الصناعة عمليات غربلة بمساعدة ربوتات (robot) من أجل غربلة مكتبات ضخمة للمواد الكيميائية (100000 مادة أو أكثر)، وبالتالي معرفة قدرتها على التآثر مع الهدف الدوائي. إذ يمكن للكيمياء الاندماجية أن تزيد من حجم هذه المكتبات إلى ما لا نهاية تقريباً. لذلك يعتبر العامل المحدد للنجاح في إجراء عمليات الغربلة الشاملة لمثل هذه المكتبات الضخمة جداً، توفر معايرة سريعة ومؤكَّدة للتآثر بين الدواء والهدف. عادة ما تجري التحاليل في أطباق معايرة دقيقة (microtiterplates) تحتوي على 96 بؤرة، وأحياناً على 384 بؤرة. لكن تكنولوجيا رقاقة السيلكون (silicon-wafer) مندمجة مع مطياف الليزر الماسح خفضت أحجام بؤر التفاعل إضافياً حتى مستوى النانو (10^{-9})، ما يسمح لمعايرة أكثر من 10000 مادة كيميائية في اليوم.

التصميم المنطقي للدواء (Rational drug design). على الرغم من أن بنيات الأشعة السينية (X-ray) لأغلب الأهداف الدوائية لا تزال غير معروفة، فقد استمر العلماء في استخدامهم محاولات استنتاج خصائص الارتباط للأدوية بواسطة القياس المنظومي لارتباط المواد الكيميائية النظيرة، ما قاد إلى ما يعرف باسم العلاقات الكمية بين البنية والفعالية (quantitative structure-activity relationships (QSAR)). وبذلك، اعتماداً على نموذج بنية موقع الارتباط المشتق من هذه التحاليل، فقد حاول العلماء أمثلة بنية الدواء الجديد باستخدام النمذجة الجزيئية ومقاربات حاسوبية أخرى.

الأفاق المستقبلية (Future aspects). في الصناعات الدوائية، يصل دواء واحد فقط إلى السوق من بين 50000 مادة كيميائية مختبرة. وعلى الصعيد العالمي، يدخل فقط 30 مركباً كيميائياً (new chemical entities (NCEs)) بالعام كمواد جديدة فعالة حيز المركبات الدوائية. ونظراً إلى وجود العديد من الأمراض المستعصية وأيضاً لأسباب اقتصادية، تحاول الشركات الدوائية العالمية زيادة فرص نجاحها باستخدام الغربلة المعتمدة على الهدف (target-based screening). إضافة إلى ذلك، هناك مفهوم آخر (استخدام الجينوم دوائياً) يعتمد على تحليل الأمراض الفردية المرتبطة بالتعدادات الشكلية (polymorphism). فإذا أمكن تحديد الأهداف الفردية، بواسطة مصفوفات الـ DNA على سبيل المثال، فعندئذٍ يمكن تفصيل الأدوية لتلائم بروتين كل شخص ينخرط بالتنظيم والأيض، ما يقود إلى أدوية شخصية مع عدد أقل من التأثيرات الجانبية.

غـربلة الـدواء

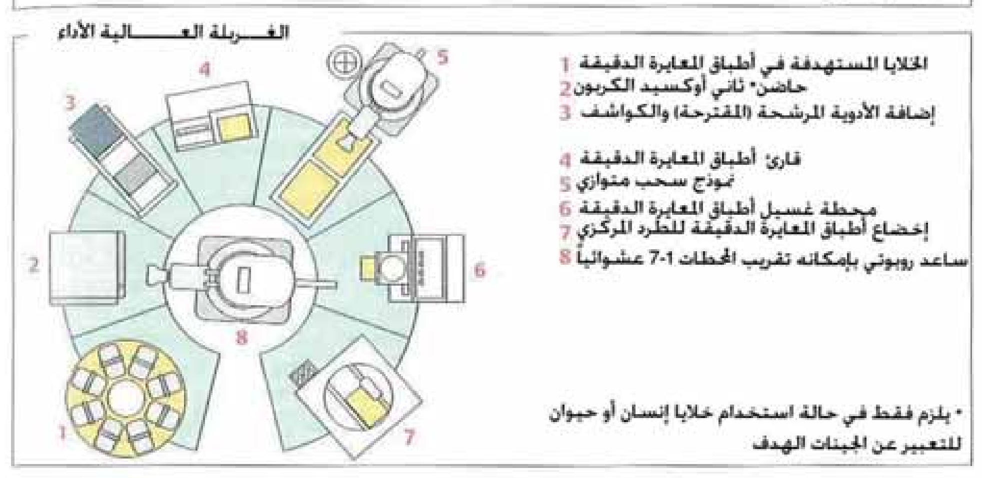


أهداف الدواء البشري

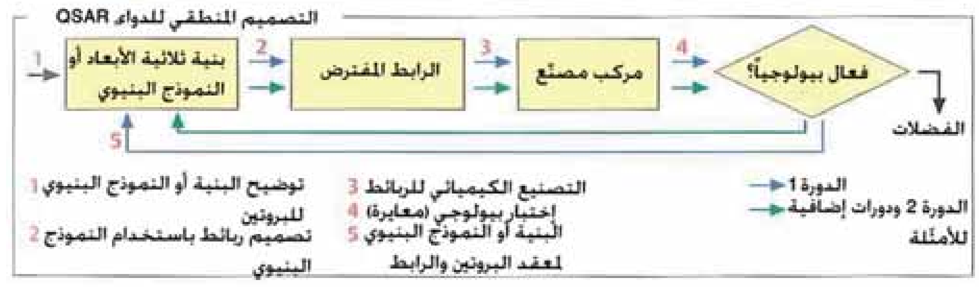
التطبيق	مثال	العدد*	
دواء الألزهايمر	إستيراز الأسيتيل كولين	8000	الأنزيمات
الفصام	مستقبل السيروتونين	15000	المستقبلات
أمراض التقدم في العمر	قناة أيون الكالسيوم	3000	القنوات الأيونية

• الإنسان، تقديرات

الغـربلة العـالية الأداء



التصميم المنطقي للدواء QSAR



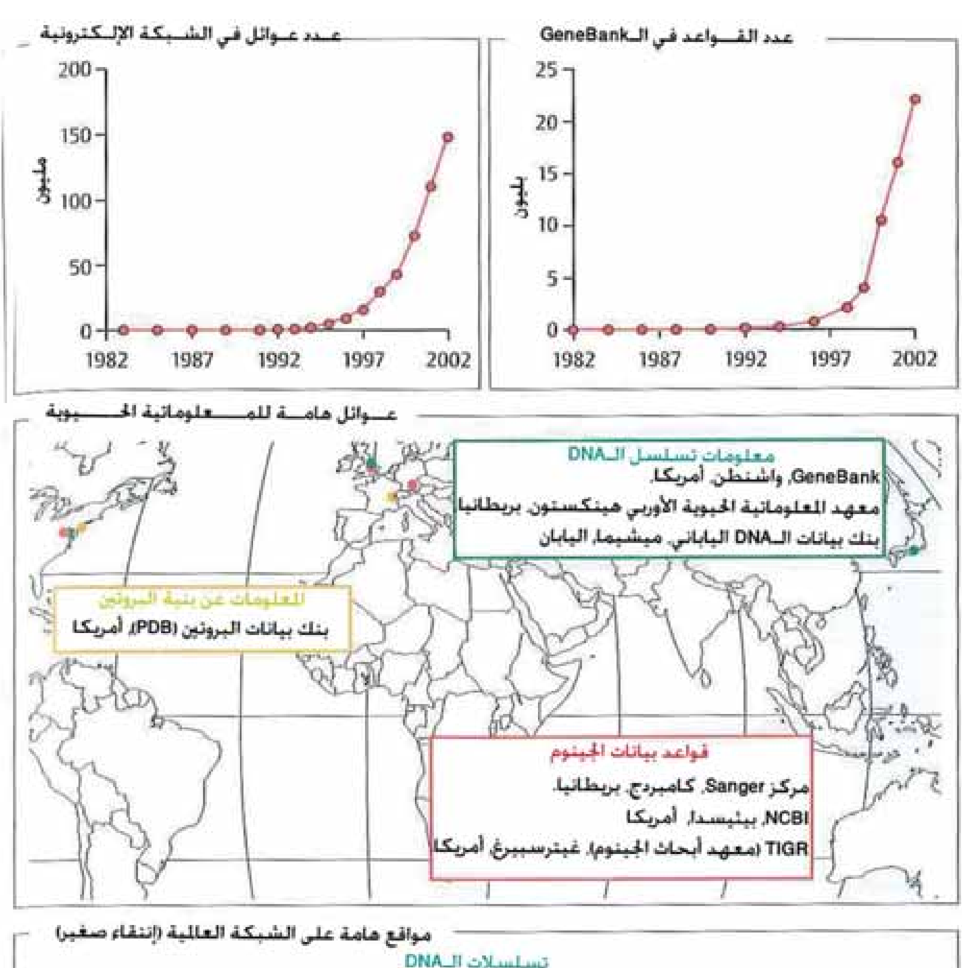
المعلوماتية الحيوية (Bioinformatics)

عموميات (General). لا يمكن تصور التقدم السريع في علم الأحياء الجزيئية بدون التطورات المثيرة في استخدام تكنولوجيا الحاسوب والاتصالات ـ وهما تقانتان تؤمنان إمكانيات التخزين، والفرز السريع، والاسترجاع على الصعيد العالمي لكميات كبيرة من البيانات الحيوية. تشكل الشبكة العالمية، التي تم تأسيسها مع بداية عام 1970 لخدمة الاتصالات السلكية واللاسلكية العلمية داخل الولايات المتحدة الأمريكية، التي بدورها تشكل جزءاً من الإنترنت، منصة الاتصالات لتبادل البيانات. واليوم، تمتد الشبكة لتغطي العالم بما يفوق 35 مليون خادم ويب (web server) وأكثر من 100 مليون مستخدم، وهو رقم يتزايد سنوياً. بعيداً عن الاستخدام التجاري المسيطر للشبكة، تمكن الإنترنت من التبادل العالمي للبيانات العلمية، واسترجاعها على الصعيد الجماعي أو الفردي، وكذلك تنظيمها. يشتمل مصطلحا المعلوماتية الحيوية (bioinformatics) والاستخدام الحيوي لتكنولوجيا الحاسوب (biocomputing) على معالجة وتجهيز المعلومات الخاصة بتسلسلات الـ DNA والبروتين، وبنيات البروتين أيضاً، والموجهة بشكل متزايد نحو فهم أكبر للجينومات والبروتيومات لجميع الكائنات بما فيها الإنسان.

معلومات التسلسل (Sequence information). قاد التطبيق الواسع والسرعة العالية في سلسلة الـ DNA إلى زيادة حادة في عدد تسلسلات الـ DNA المخزنة والمتاحة للعموم. مع نهاية عام 2002، تجاوز عدد القواعد النيوكليوتيدية الإجمالية المسلسلة من الـ DNA 20 تريليون ($2 x10^{10}$). وقد سمح تخزين هذه البيانات في بنك بيانات عالمي واحد، مع 3 مواقع مقابلة في كل من أمريكا، اليابان وأوروبا (المملكة المتحدة)، بالإضافة إلى إدخالها عبر الشبكة العالمية، إمكانية استخدامها من قبل العلماء لمقارنة بيانات تسلسلات جديدة للـ DNA بالوقت الحقيقي مع التسلسلات المعروفة، وكذلك إمكانية استخدامهم لهذه المعلومات من أجل الوصول إلى نتائج حول تعريف أو تطابق ما بين تسلسل الـ DNA أو البروتين الذي بين أيديهم والجينات أو البروتينات المعروفة سابقاً. من أهم قواعد البيانات الخاصة بالمعلومات عن التسلسل البروتيني القاعدة PIR (مصادر معلومات البروتين (Protein Information Resource)) في واشنطن D.C، التي تتضمن 280000 مدخل، والقاعدة SwissProt في Geneva التي تتضمن 120000 مدخل.

المعلومات البنيوية (Structural information). لقد نمت البيانات الخاصة بالبنيات الثلاثية للبروتينات بسرعة أقل نسبياً مع معلومات التسلسل لاعتمادها بشكل أساسي على تحليل الأشعة السينية (X ray) التي تتضمن تحضيراً طويلاً للبلورات ومشتقاتها ذات المعادن الثقيلة (heavy-metals). تعتبر هذه المشكلة التجريبية عقبة أساسية أمام تحليل المعقدات البروتينية الضخمة وبروتينات الغشاء، المشكلة حوالى 30٪ من البروتينات المعروفة. يعتبر تحليل بنية البروتين بواسطة جهاز الرنين النووي المغناطيسي (NMR) متعدد الأبعاد، إجراءاً بديلاً قابلاً للتطبيق على البروتينات الموجودة في المحلول، ولكنه حالياً محدود بالبروتينات ذات الكتلة المولية الأصغر من 30KDa. على الرغم من هذه الصعوبات التجريبية، فقد تجاوز عدد البنيات البروتينية المتاحة في بنك بيانات البروتينات ((Protein Data Base (PDB)) مع نهاية عام 2002 أكثر من 18000 بنية، بزيادة قدرها حوالى 3000 بنية بالعام. يمكن، إذا كان مقدار التطابق بين تسلسل البروتين (لبروتين ذي بنية ثلاثية غير معروفة) الذي تتم دراسته وتسلسل بروتين ذي بنية محددة تجريبياً أكثر من 30٪، بناء نموذج بنيوي للبروتين المجهول على الحاسوب باستخدام محاكاة المجانَسة (homology modeling)؛ إذ باستطاعة الفرد حالياً أن يجد في القواعد البنيوية حوالى 100 إلى 150 بنية بروتين مختلف. ومع أن العدد النظري للتسلسلات البروتينية المحتملة كبير وضخم (يبلغ العدد المحتمل للتسلسلات المختلفة لبروتين مكون من 300 حمض أميني حوالى 20^{300})، فإن هناك فقط تركيبين بنيويين ثانويين (حلزون ألفا (α helix) وصفيحة بيتا (β sheet)) مستقران نسبياً، مما يخفض العدد المحتمل للبنيات البروتينية بشكل كبير. علاوة على ذلك، يبدو أن البنيات الأكبر تتشكل بطريقة معيارية. كما ويعتقد أن عدد البنيات الأساسية لا تزيد على 1500. يحاول **علم دراسة الجينوم البنيوي** (*structural proteomics*) توقع بنية ووظيفة جميع البروتينات في البروتيوم (proteome) واستخدام هذه المعلومات لفهم بنيات البروتينات الإجمالية.

التحليل الوظيفي (Functional analysis). يركز العديد من المواقع الشبكية المتخصصة على أنزيمات مفردة مثل الأستيل كولين إستيراز (acetyl cholinesterases)، القنوات الأيونية، المستقبلات، السايتوكينات (cytokines) والمعلومات الجينومية. إضافة إلى ذلك، هناك محاولات لتحليل تغير التدفق الأيضي (metabolic fluxes) في جميع الكائنات (الهندسة الأيضية)، وكذلك شبكات نقل الإشارة المعقدة فيه (ديناميكية النظام).



مواقع هامة على الشبكة العالمية (إنتقاء صغير)

	تسلسلات الـDNA	
GeneBank قاعدة بيانات EMBL قاعدة بيانات الـDNA في اليابان (ثلاث مواقع متطابقة)	>200 بليون زوج قاعدي (كانون الأول عام 2002)	www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html www.ebi.ac.uk/embl/index.html www.ddbj.nig.ac.jp
	معلومات الجينوم	
مركز سينجر (Sanger)	جينوم الإنسان، جينوم الفأر وجينومات عديدة أخرى	www.sanger.ac.uk
المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية (NCBI)	جينوم الإنسان، جينوم الفأر وجينومات عديدة أخرى	www.ncbi.nlm.nih.gov
قاعدة بيانات TIGR	المئات من الجينومات التامة السلسلة أو الغير منتهية	www.tigr.org
	بنيات البروتين	
بنك بيانات البروتين (PDB)	>18000 بنية بروتين	www.pdb.bnl.gov
	معلومات البروتيوم	
معهد SWISS للمعلوماتية الحيوية (ExPASy)	>8000 تسلسل بروتين بشري مستكشف وأكثر	us.expasy.org

الأيض ـ الاستقلاب ـ (Metabolism)

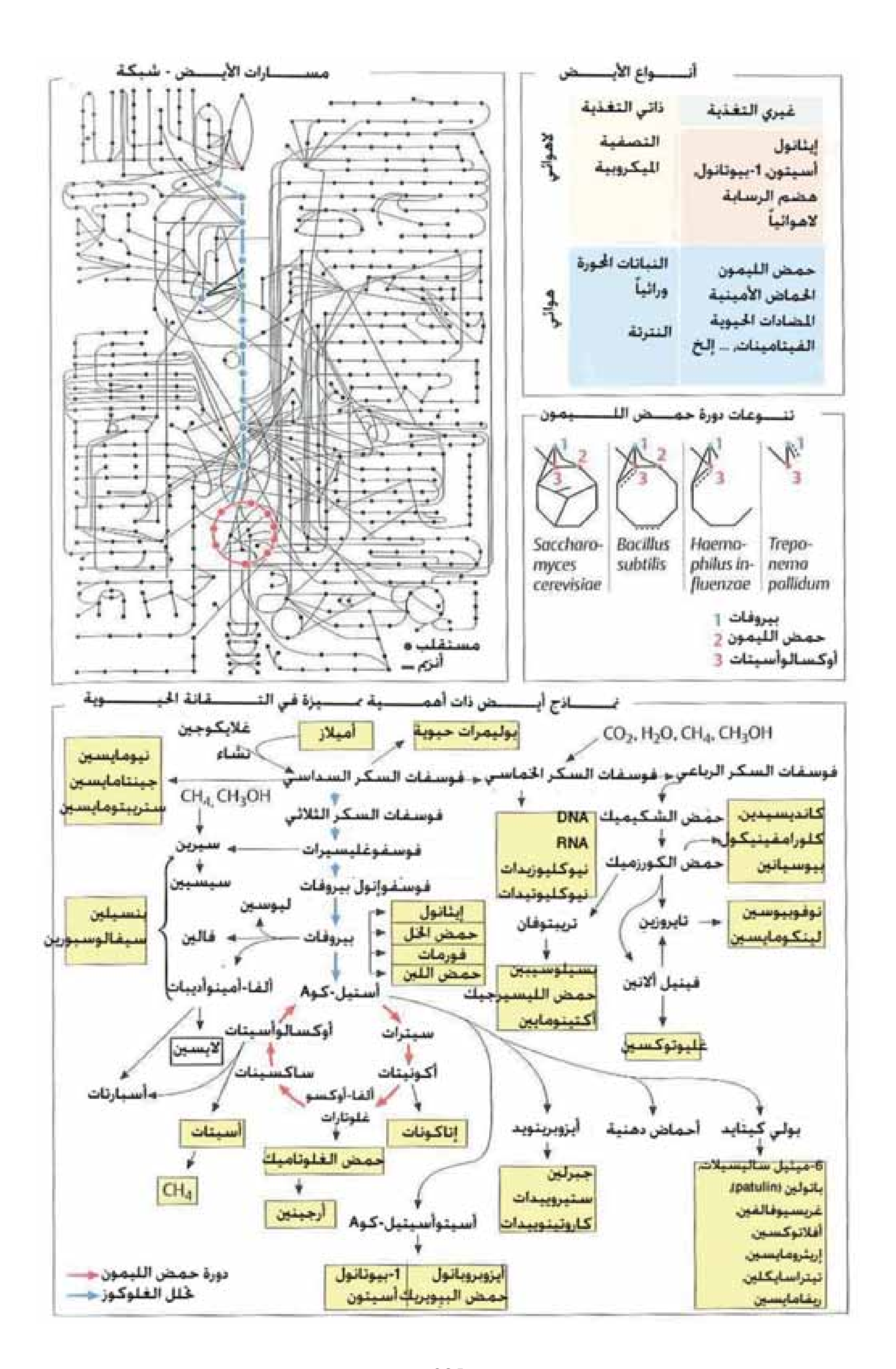
عموميات (General). على الرغم من انقضاء أكثر من 4 بلايين عام من الحياة على سطح الأرض، التي قادت إلى تنوع كبير في الكائنات الحية، فإن الوحدات البنائية الأساسية وأنماط أيضها وتضاعفها اعتمدت على اختلافات قليلة في مبادئها الأساسية؛ إذ تجاوز عدد الأنواع المليون نوع إلى حد بعيد، لكنه تم تصنيف عدة آلاف فقط من الوظائف الأنزيمية المختلفة، كما يكفي عدة مئات من آلاف البروتينات (يتماثل العديد منها بشكلٍ كبير مع كائنات حقيقية النوى وحيدة الخلية مثل الخميرة *Saccharomyces cerevisiae*) لبناء وصيانة كائن أعلى مثل الإنسان. تشكل جميع الكائنات الحية على سطح الأرض شبكة بيئية حساسة تضم آلافاً عديدة من الأنواع المتخصصة التي تحيا تحت شروط بيئية متنوعة جداً (أعشاش بيئية). يكمن التفريق الرئيسي بين هذه الكائنات في كون بعضها ذاتي التغذية (autotrophic)، تستخدم الـ CO_2 كمصدر أساسي للكربون، وبعضها الآخر غيري التغذية (heterotrophic)، تحتاج إلى المركبات العضوية للنمو. كما يكمن التفريق الآخر في كونها كائنات هوائية، تنمو بوجود الهواء، أو كائنات لاهوائية. وبالنظر إلى تفاصيل عمليات الأيض فإنها تختلف بين الكائنات أيضاً، على سبيل المثال، من خلال كيفية تمثيل الغلكوز: عبر مسار فروكتوز ـ 1، 6 ـ بيس فوسفات (fructose-1,6-bisphosphate) (تحلل الغلوكوز (gycolysis))، أو مسار الفوسفات الخماسي (pentose phosphate)، أو مسار 2 ـ كيتو ـ 3 ـ ديأوكسي ـ 6 ـ فوسفوغلوكونات (2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate). ومع انجاز سَلسَلة الجينوم، أصبحت المشاهدة المثيرة للفروقات البنيوية والأيضية ممكنة، مما يساعد على فهم أفضل لكيفية تأقلم الكائن مع بيئته الخاصة. كما يتم السير بخطوات واسعة في فهم الشبكات التنظيمية داخل الكائنات والتفاعلات المتبادلة البيئية فيما بينها (ديناميكية النظام، علم الضبط الحيوي)، إضافة إلى تعلم محاكاة الأنظمة الحية المعقدة حاسوبياً (in-silico). أما في مجال التقانة الحيوية، فتتجلى الفائدة الأساسية في تعديل الأيض، مثلاً، زيادة عطاء المنتج، والتخلص من المنتج الثانوي، أو في التربية، لإقحام أو إزالة صفة نمط ظاهري (phenotype). كما وتُعزَّز أكثر فأكثر الطرائق التقليدية في التصالب (crossing) أو التطفير (mutation) المتبوعة بالانتقاء، وذلك من خلال الهندسة الوراثية.

أيض التغذية الذاتية (Autotrophic metabolism). تختزل الكائنات ذاتية التغذية غاز ثاني أوكسيد الكربون (CO_2) إلى مصادر كربونية مثل الغلوكوز. وتحصل الكائنات الضوئية التغذية (phototrophic) مثل النباتات، الطحالب (algae) والبكتريا الزرقاء (cyanbacteria) على الطاقة اللازمة لهذه العملية من الضوء الذي تحوله ضمن مراكز التفاعل الضوئي إلى طاقة كيميائية مختزنة على شكل أدينوزين ثلاثي الفوسفات ATP («العملة العالمية للطاقة»). أما الكائنات جمادية التغذية (lithotrphic)، فتشتق الطاقة من أكسدة المركبات غير العضوية مثل N، S والأيونات المعدنية. تشمل الكائنات ذاتية التغذية الهامة في التقانة الحيوية النباتات المحورة وراثياً، البكتريا المثبتة للآزوت (nitrifying bacteria) والـ *Thiobacilli* المستخدمة تصفية المعادن.

أيض الكائنات اللاهوائية غيرية التغذية (Heterotrophic anaerobic metabolism). تستخدم الكائنات اللاهوائية غيرية التغذية في التقانة الحيوية لإنتاج الإيثانول (ethanol)، الأسيتون (aceton)، البيوتانول (butanol) وحمض اللبن (lactic acid). تولد هذه الكائنات مركب الطاقة، ATP بواسطة هدم (catobolism) السكريات. وتعتبر الأوليات المشكلة للميثان (methane-forming archaea) التي تتطور في المعالجة اللاهوائية للرسابة جزءاً من هذه المجموعة؛ حيث تبدي بعض الخطوات الأيضية غير العادية. يشكل الأيض اللاهوائي كمية قليلة من الطاقة بكفاءة قليلة.

أيض الكائنات غيرية التغذية الهوائية (Heterotrophic aerobic metabolism). تبدي معظم الكائنات المجهرية المستخدمة في التقانة الحيوية أيضاً هوائياً غيري التغذية. إن معظم طاقة هذه الكائنات يتم توليدها عبر السلسلة التنفسية التي تغذي بدورها دورة حمض الليمون (citric acid cycle)؛ حيث يبلغ عطاؤها 36 مولاً (mole) من مركب الـ ATP لكل مول من سكر الغلوكوز، وهو عطاء كبير جداً. هناك عدة منتجات تقانية حيوية مثل حمض الليمون وحمض الغلوتاميك (glutamic acid) يتم اشتقاقها من دورة حمض الليمون التي بدورها يجب أن تغذى بمسارات ترميمية في الكائنات عالية الإنتاجية.

الاستقلاب الثانوي (Secondary metabolism). يشكل العديد من الكائنات مركبات ثانوية أيضية ليس لها دور أساسي في وظائف الخلية الأولية (مستقلبات ثانوية). في النباتات، تلعب المستقلبات الثانوية دوراً هاماً في آليات الدفاع ضد الممرضات والمفترسات وفي جذب الحشرات للتلقيح والانتشار. أما في الكائنات المجهرية، فإن الوظيفة الفيزيولوجية للمستقلبات الثانوية أقل وضوحاً، وأغلبيتها منتجات تقانية حيوية هامة مثل مضادات الحيوية، الألكلويدات (alkaloids)، المواد الصباغية، أو المركبات العطرية.



مسارات الأيض - شبكة
مستقلب
أنزيم
أنواع الأيض
ذاتي التغذية
غيري التغذية
لاهوائي
هوائي
النصفية الميكروبية
إيثانول
أسيتون 1-بيوتانول
هضم الرسابة لاهوائياً
النباتات المحورة وراثياً
النترتة
حمض الليمون
الحماض الأمينية
المضادات الحيوية
الفيتامينات... إلخ
تنوعات دورة حمض الليمون
Saccharomyces cerevisiae
Bacillus subtilis
Haemophilus influenzae
Treponema pallidum
1 بيروفات
2 حمض الليمون
3 أوكسالوأسيتات
نماذج أيض ذات أهمية مميزة في التقانة الحيوية
غلايكوجين
نشاء
أميلاز
بوليمرات حيوية
CO_2, H_2O, CH_4, CH_3OH
نيومايسين
جينتامايسين
ستربتومايسين
فوسفات السكر السداسي
فوسفات السكر الخماسي
فوسفات السكر الرباعي
CH_4, CH_3OH
فوسفات السكر الثلاثي
DNA
RNA
نيوكليوزيدات
نيوكليوتيدات
حمض الشكيميك
كانديسيدين
كلورامفينيكول
بيوسيانين
سيرين
فوسفوغليسيرات
حمض الكورزميك
سيستين
فوسفوإينول بيروفات
بنسيلين
سيفالوسبورين
ليوسين
إيثانول
حمض الخل
فورمات
حمض اللبن
فالين
بيروفات
تريبتوفان
تايروزين
نوفوبيوسين
لينكومايسين
ألفا-أمينوأديبات
أستيل-كوA
سيلوسيبين
حمض الليسيرجيك
أكتينومايسين
فينيل ألانين
أوكسالوأسيتات
سيترات
غليوتوكسين
لايسين
ساكسينات
أكونيتات
أسبارتات
ألفا-أوكسو غلوتارات
أسيتات
إيتاكونات
أيزوبرينويد
أحماض دهنية
بولي كيتايد
CH_4
حمض الغلوتاميك
جبرلين
ستيرويدات
كاروتينويدات
6-ميثيل ساليسيلات
باتولين (patulin)
غريسيوفالفين
أفلاتوكسين
إريثرومايسين
تيتراسايكلين
ريفامايسين
أرجينين
أسيتوأسيتيل-كوA
1-بيوتانول
أيزوبروبانول
حمض البيوتريك
أسيتون
دورة حمض الليمون
تحلل الغلوكوز

الهندسة الأيضية (Metabilic engineering)

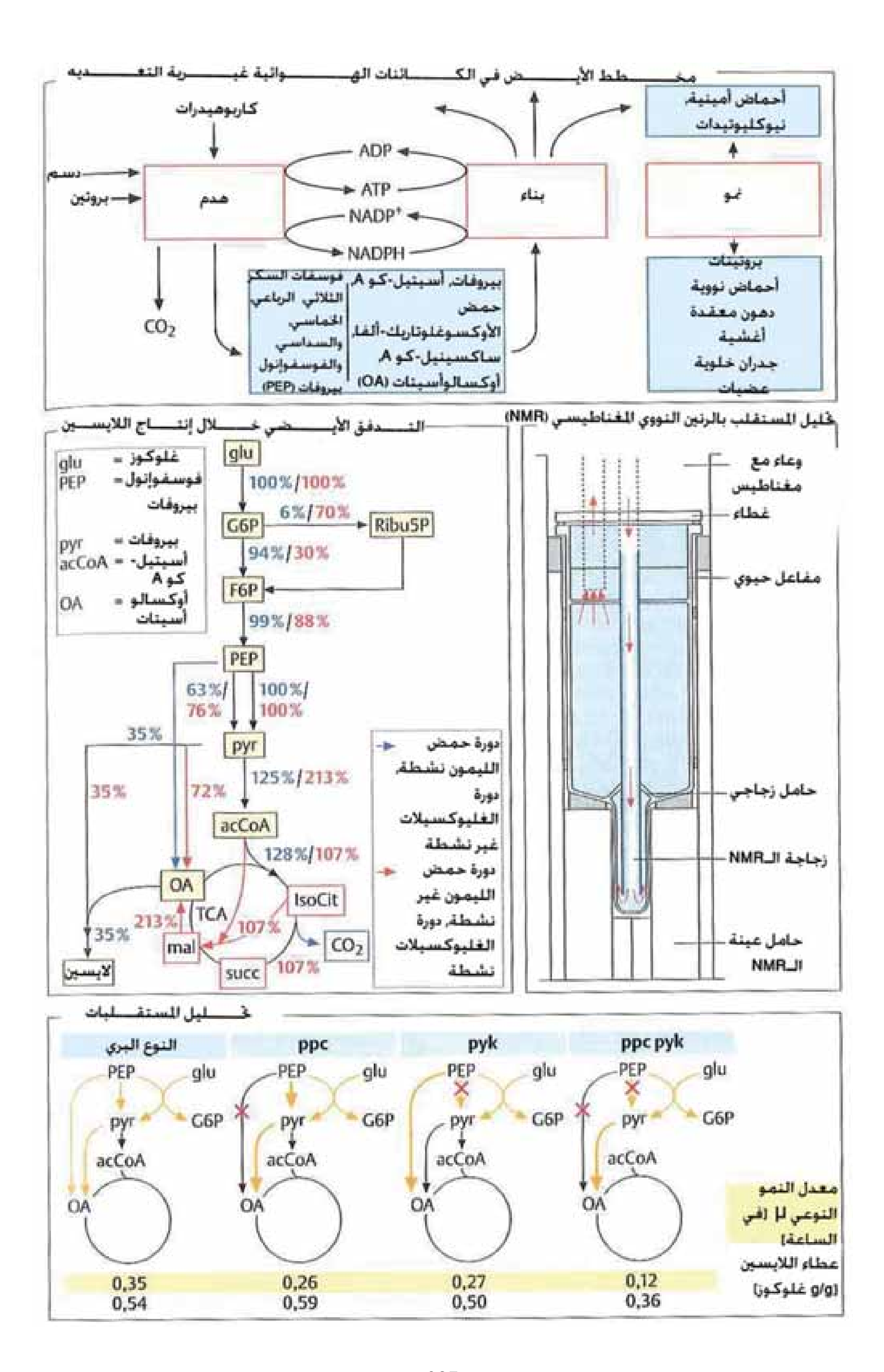
عموميات (General). قاد التطور والتقدم المعرفي العميق بعمليات الأيض ومساراته وتنظيمها إلى محاولات جادة في وصف التدفق الأيضي (metabolic flux) الكامل لجميع الخلايا، باستخدام النمذجة الرياضية، والمحاكاة الحاسوبية وتقنيات قياس دقيقة وسريعة. واعتماداً على هذه التحاليل، يسعى المستكشفون إلى تعديل الأيض، والوظائف التنظيمية وشبكات الإشارات لتوجيه التدفق الأيضي نحو منتج مرغوب أو لأقلمته مع مصدر كربوني مرغوب (الهندسة الأيضية). وعادة ما يتضمن هذا الإجراء التجريبي هندسة وراثية لخطوة مفتاحية في التصنيع أو الهدم (التصميم الأيضي).

تحليل التدفق الأيضي (Metabolic flux analysis). يمكن عند فهم الكيمياء الحيوية لمسار أيضي ما، صياغة نظام من المعادلات المتوازنة لكل مركب وسيط وجمعها مع بعضها البعض في قالب قياس رياضي (stoichiometric matrix)، ثم باستخدام هذه المعادلات تحت شروط تم وضعها يمكن حساب التدفق الأيضي ضمن هذا المسار. من أهم الشروط الواجب مراعاتها إمكانية القياس الكمي لنقل الكتلة **إلى ومن البيئة عبر غشاء الخلية (أخذ المركب الأولي** (substrate) وتحرير المنتج). إلا أن ذلك يمكن أن يكون غير كاف لحل نظام معادلات التوازن بشكل واضح. فمن الضروري في الحالة القياسية للتدفقات الأيضية عبر مسارات إضافية، تقدير تحديد الفعاليات الأنزيمية، أو قياس سيماء التعبير عن الجينات باستخدام مصفوفات الـ DNA، أو القيام بتجارب واسمة باستخدام مسابر (probes) موسومة بنظائر مشعة (^{14}C، ^{3}H، ^{32}P، ^{35}S) أو نظائر مستقرة (^{13}C أو ^{15}N). لتحقيق هذه الغاية، تنمى الخلايا على مزائج محددة المكونات من المركبات الأولية (substrates) الموسومة بالنظائر، ويتم تحليل المستقلبات، التي تكون أحياناً جزيئات ضخمة (macromolecules) أيضاً، للكشف عن توزع النظير، باستخدام جهاز الرنين النووي المغناطيسي (nuclear magnetic resonance (NMR)) أو مطياف الكتلة (mass spextrometer (MS)). في الحالات المفضلة، ربما يسمح استخدام مثل هذه المُصاوِغات الموسومة بالنظائر (isotopomers) بتوليد نموذج رياضي للتدفق الأيضي في مسار متفرع أو حتى في كامل الخلية.

تحليل الضبط الأيضي (Metabolic control analysis). لفهم ومعرفة أي أنزيم في المسار هو المحدِّد للتدفق الأيضي، فإنه يجب تحليل تراتبية التحكم بالتدفق. بصيغة أخرى، يجب علينا معرفة التغير التجزئي (fractional change) في فعاليات جميع الأنزيمات المُتَضَمَّنة، الذي يمتلك التأثير الأكبر في المسار الإجمالي. عادة ما يكون هذا النوع من الضبط أو التحكم موزعاً ضمن عدة أنزيمات. وبذلك، من أجل تحديد مكافئ التحكم لكل أنزيم، فإنه يتم تعديل التعبير عن هذه الأنزيمات عن طريق الهندسة الوراثية، وبعد ذلك القيام بتحليل التغير الناجم في التدفق الأيضي كمياً، أو كبديل عن ذلك، يمكن حساب مكافئات التحكم بالتدفق اعتماداً على نماذج رياضية تصف بشكل مناسب المعايير الحركية لشبكة المسار الذي تتم دراسته. وبغية توثيق هذه النماذج تجريبياً، تقاس المستقلبات داخل الخلية تحت شروط تجريبية مؤقتة؛ الذي يتم، على سبيل المثال، من خلال تحفيز زرعة خلوية ساكنة بإضافة المركب الأولي (substrate) (مثل الغلوكوز) وقياس استجابة الخلية عن طريق تحليل جميع التراكيز الداخلية ذات العلاقة في المزيج.

التطبيقات (Applications). تستخدم غالباً هذه الطرائق في الكائنات المجهرية من أجل 1) تعزيز طيف المركبات الأولية، 2) توسيع إمكانيتهم على التفكيك الحيوي (biodegradation)، و3) زيادة عطاء إنتاج المستقلبات.

على سبيل المثال، تمت كلونة مشغل اللاكتوز (lactose operon) بنجاح والتعبير عنه في *Zymomonas mobilis*، مما سمح باستخدام مصل اللبن من أجل إنتاج الإيثانول، وكذلك في *Corynebacterium glutamicum* لإنتاج اللايسين (lysine) وحمض الغلوتاميك (glutamic acid) من مصل اللبن. كما تم عن طريق كلونة الجينات الخاصة بأيض المركبات العطرية ضمن بكتريا *Pseudomonas sp.B13*، الحصول على طافرات مهندسة، تختلف عن السلالة البرية حيث استطاعت النمو على مركبات عطرية مكلورة (chlorinated) أو مضاف إليها الميثيل (methylated). وتدرس زيادة تشكل المنتج بواسطة الهندسة الأيضية لعدة أغراض، مثلاً، لإنتاج الأحماض الأمينية، الإيثانول، البولميرات الحيوية، والفيتامينات وأيضاً لإنتاج المستقلبات الثانوية كمضادات الحيوية. على سبيل المثال، قاد التحليل الشامل للتدفقات الأيضية المنافسة خلال التصنيع الحيوي وإفراز اللايسين (L-Lysine) في *Corynebacterium glytamicum* إلى استراتيجية زادت من عطاء اللايسين بمقدار 50٪ باستخدام الوراثة الجزيئية لإعادة توجيه التدفق.


مخطط الأيض في الكائنات الهوائية غيرية التغذية
كاربوهيدرات
دسم
بروتين
هدم
ADP
ATP
NADP+
NADPH
بناء
أحماض أمينية، نيوكليوتيدات
نمو
بروتينات
أحماض نووية
دهون معقدة
أغشية
جدران خلوية
عضيات
CO2
فوسفات السكر الثلاثي الرباعي الخماسي والسداسي والفوسفوإنول بيروفات (PEP)
بيروفات، أسيتيل-كو A، حمض الأوكسوغلوتاريك-ألفا، ساكسينيل-كو A، أوكسالوأسيتات (OA)
التدفق الأيضي خلال إنتاج اللايسين
glu = غلوكوز
PEP = فوسفوإنول بيروفات
pyr = بيروفات
acCoA = أسيتيل-كو A
OA = أوكسالو أسيتات
glu
100%/100%
G6P
6%/70%
Ribu5P
94%/30%
F6P
99%/88%
PEP
63%/76%
100%/100%
35%
pyr
125%/213%
35%
72%
acCoA
128%/107%
OA
IsoCit
TCA
213%
107%
35%
mal
CO2
succ
107%
لايسين
دورة حمض الليمون نشطة، دورة الغليوكسيلات غير نشطة
دورة حمض الليمون غير نشطة، دورة الغليوكسيلات نشطة
تحليل المستقلب بالرنين النووي المغناطيسي (NMR)
وعاء مع مغناطيس
غطاء
مفاعل حيوي
حامل زجاجي
زجاجة الـNMR
حامل عينة الـNMR
تحليل المستقلبات
النوع البري
ppc
pyk
ppc pyk
PEP
glu
pyr
G6P
acCoA
OA
معدل النمو النوعي μ (في الساعة)
عطاء اللايسين (g/g غلوكوز)
0,35
0,54
0,26
0,59
0,27
0,50
0,12
0,36

• علم أحياء (بيولوجيا) النظم (Systems biology)

عموميات (General). إن علم أحياء النظم هو مجال بحثي حديث يهدف إلى وصف وظائف الخلايا بشكلٍ متكامل. يعتمد هذا العلم على التحليل الوظيفي للمركبات الأيضية، والتنظيمية وناقلة الإشارة، التي هي أجزاء وظيفية تجتمع مع بعضها البعض لتقدم نموذجَ خليةٍ قائماً على التجربة ويسمح بتوقعات تفاعلية عن سلوك الخلية. يكمن هدف علم أحياء النظم البعيد المدى في، على سبيل المثال، دعم التجارب السريرية بواسطة دراسات المحاكاة. وباستخدام المماثلة، يعتبر هذا العلم خريطة طرق ديناميكية للخلية، التي تضم أنماطاً مرورية، وسبب ظهور هذه الأنماط، وكيفية التحكم بهم.

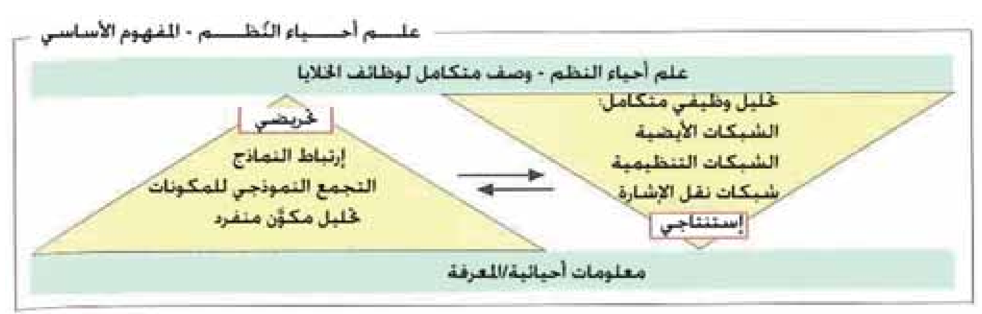
المكونات المفتاحية (key components). قبل تجميع المعلومات على النظام الحيوي، يجب أن تصبح البيانات التفصيلية عن **بنية النظام** (*system's structure*) متاحة. وهي تضم وظائف الجينات وتآثرها فيما بينها، وبنيات البروتينات، والمسارات الكيميائية حيوية، والآليات المسؤولة عن تعديل البنيات الخلوية الداخلية (intracellular structures) والبنيات الخلوية المتعددة (multicellular structures). أما الخاصية المفتاحية الثانية للخلايا الحية فتكمن في قدرتها على المرور بتغيرات حركية (ديناميكية)، استجابةً لعوامل داخلية أو خارجية توصف بـ **دراسات المحاكاة** (*simulaton studies*)؛ التي تسمح بتعريف الآليات الضرورية المسؤولة عن سلوكيات معينة. كما يجب توضيح **عوامل التحكم** (*control factors*) التي تقلل القصور الوظيفي. وفي الختام، تساعد **مبادئ التصميم** (*design principles*) والمحاكاة على تجميع النماذج المشار إليها في نظام وظيفي شامل.

القياس (Measurment). يتطلب أي تحليل للتنظيم الحيوي في نظام حي معقد قواعد بيانات شاملة، مثل، وضع سيماء لسَلسَلة الجينات والتعبير عنها (الجينوم والترانسكريبتوم ـ مجموع جزيئات المنسوخ ـ (transcriptome))، وتحليل البروتيوم (proteome)، والقياس المتزامن للفعالية الأنزيمية والمستقلبات (مجموع المستقلبات في الحي ـ ميتابوليم ـ (metabolome)) في غضون أجزاء من الميللي ثانية، وذلك من أجل متابعة أحداث عمليات الاستقلاب تحت شروط معرّفة بشكل جيد مع أداء عالٍ. وتعتبر القياسات ذات الجزيء المفرد بواسطة الأجهزة النانونية الروبتية والفيمتوليزر (femtolasers) التي تسمح بإظهار التآثرات الجزيئية أمثلة تقليدية للقياس (كالـ interactome). أما النظم السائلة الدقيقة مثل جهاز التحليل الكلي الدقيق (micro total analysis system (μ-TAS))، فهي نظم متطورة تسمح بقياس أجزاء تبلغ ما يقارب بيكوليترات (10^{-12}) من العينة بسرعة ودقة. كما أن هناك تقنيات عديدة أخرى كالـ PCR ومعدات الهجرة الكهربائي الشعرية (capillary electrophoresis) لفصل البروتينات، يتم حالياً تصغيرها لتتبع، على سبيل المثال، مستويات الـ RNA الرسول وتعديلات البروتين.

القوة والمتانة (Robustness). تبدي النظم الحيوية قوة ومتانة كبيرة تمكنها من السيطرة وحماية الخلية إذا ما خرج أحد الأنظمة الفرعية عن السيطرة. وتضم المعايير الظواهرية المتعلقة بالقوة والمتانة: 1) القدرة على مكافحة التغيرات البيئية؛ 2) عدم الحساسية النسبية للنظام بشأن التغيرات الحركية؛ 3) تحطم رشيق لوظائف النظام بعد الضرر بدلاً من الانهيار الكارثي. يتم تحقيق هذا السلوك بواسطة أنظمة تحكم متعددة مثل التحكم الاسترجاعي السلبي والتحكم الاسترجاعي الأمامي، ووفرة وثباتية بنيات الوظائف الضرورية، والقدرة على التعديل والتكيف التي تتضمن العزل الفيزيائي أو الوظيفي للنظم الفرعية المتضررة مما يمنع انتشار أحد الوحدات المعطلة إلى وحدات أخرى.

الأدوات الحاسوبية (Computational tools). تستخدم بكثرة الأدوات الحاسوبية المصممة أصلاً لأهداف الهندسة العامة في النظم الحيوية. فبسبب كون عمليات إدخال البيانات، وإدراتها، وإظهارها، وتحليل النظم الخلوية على مستوى ضخم مهمة معقدة وتحدٍ كبير، فقد تم تطوير العديد من برامج النذمذجة والمحاكاة لتسهيل ذلك. حديثاً، ظهر نظام cell ML (cell Mark-up language) و SBML (Biology Mark-up language) كمقايسات واعدة في تعريف نموذج القراءة الحاسوبي المعتمد على نظام XML. تمكن هذه المقايسات من تبادل النماذج، بغضّ النظر عن الأداة الحاسوبية المستخدمة. كما وقد بُنيَ علم أحياء النظم Workbench (SBW) على طريقة SBML وهو يؤمن إطار عمل لبرنامج نمذجة مفتوح يمكن مشاركته بين عدة مراكز بحثية لمشاريع تعاونية.

الاتحادات والتطبيقات (Consortia and applications). ينفذ العديد من المشاريع الأساسية حالياً في الولايات المتحدة الأمريكية (مثلاً، حلف التأشير الخلوي، (Alliance for cellular Sialling) AFCS، واليابان (مثلاً، مشروع (Kitano)، وألمانيا (علم أحياء النظم لخلية الكبد).



مصطـلحات وطـرائق تجـريبية

المصطلح	البيانات الكمية	الطرائق
الميتابولوم	المستقلبات	طريقة LC-MS السريعة الربوتية، المعايرات الأنزيمية، تحليل آثار N15, C13 إعتماداً على الـNMR
الجينوم	وظيفة الجينات	تجارب إنقاص جين محدد
الترانسكريتوم	التشكل التفاضلي للـmRNA	سيماءات التعبير باستخدام مصفوفات الـcDNA
البروتيوم	تصنيع وتعديل البروتينات تفاضلياً	MALD-TOF أو الرذاذ الالكتروني المزود بمطياف كتلة، الهجرة الكهربائية الثنائية الأبعاد على الهلامة
"الإنتراكتوم"	التأثرات البروتينية-بروتينية التفاضلية	نظام الهجينين، المجهر الالكتروني الذري، النقل الالكتروني الرنيني المفلور.

شبـكة نقـل الإشـارات

عامل النمو المحوّل بيتا (TGF-β)
شبكة نقل الإشارة في خلايا الثدييات، المعتمدة على 553 تفاعل و561 تجمع. غالبية التجمعات عبارة عن بروتينات أو أنزيمات مفعّلة بالفسفرة

النقاط الحمراء: خطوات التفاعل
النقاط الزرقاء: التجمعات

الزمن الظاهري لمركبات شبكة منتقاة
(المحور Y: التراكيز المُعايرة
المحور X: الزمن)

■ مسائل أمانية، أخلاقية واقتصادية

• الأمان في الهندسة الوراثية

(Safety in genetic engineering)

عموميات (General). مع بداية تطوير تقنية الـ DNA المؤشَّب ((recombinant DNA (rDNA))، عبَّر العلماء عن مخاوفهم من أمان التقنيات المستخدمة في نقل الجينات من كائن إلى آخر. وبعد فترة من التوقف وبدافع ذاتي من العلماء في أمريكا والمملكة المتحدة بعد مؤتمر أسيلومار (Asilomar) عام 1975، أصبح الأمان في الهندسة الوراثية حالياً يخضع في جميع البلدان الصناعية للأنظمة، وفي بعضها الآخر إلى قوانين، مع وجود اختلافات هامة في التفاصيل، مثلاً، في إجراءات الاحتواء المطلوبة.

إرشادات المعهد الوطني للصحة (NIH) في الولايات المتحدة الأمريكية. إن عملية تقدير المخاطر هي عملية ذاتية في نهاية المطاف. ويجب على الباحث القيام بعملية تقدير أولية للمخاطر بالاعتماد على مجموعة الخطر ((risk group (RG)) لكل عامل. تصنف العوامل الخطر في أربع مجموعات حسب إمكانية أمراضهم النسبية للإنسان السليم باستخدام المعايير التالية: 1) عوامل تتبع مجموعة الخطورة 1 (RG1) وهي عوامل غير مرتبطة بمرض يصيب البشر السليمين البالغين؛ 2) عوامل تتبع مجموعة الخطورة 2 (RG2) وهي عوامل ترتبط بمرض بشري نادر الأهمية وتتوفر له طرق وقائية وعلاجية في أغلب الأحيان؛ 3) عوامل تتبع مجموعة الخطورة 3 (RG3) وهي عوامل ترتبط بأمراض خطيرة ومميتة للإنسان التي يمكن أن تتوفر لها طرق وقائية أو علاجية؛ 4) عوامل تتبع مجموعة الخطورة 4 (RG4) وهي عوامل من المرجح أن تسبب أمراضاً خطيرة أو مميتة للإنسان، التي لا تتوفر لها عادة طرق وقائية أو علاجية.

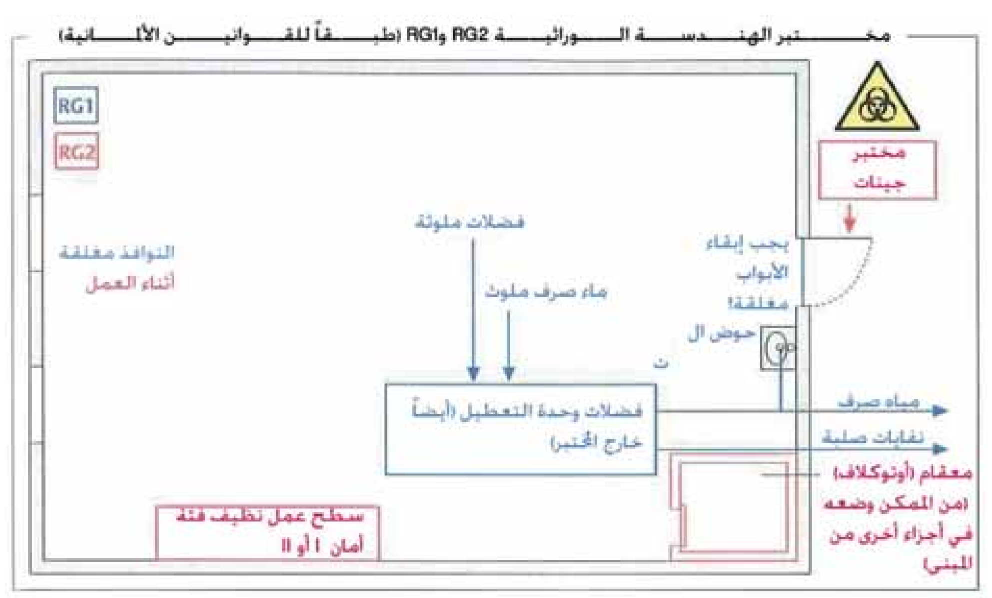
الإرشادات الأوروبية (European guildines). يجري العمل في أوروبا، باستخدام جهاز رقابي إلزامي. وهو يتطلب تقديراً للمخاطر المرتبطة باستخدام الكائنات المعدلة وراثياً ((genetically modified organisms (GMOs)). إن جميع الأعمال على الكائنات المعدلة وراثياً التي يتم تنفيذها داخل الاتحاد الأوربي تنظم بشكل صارم بواسطة التوجيهات الأوروبية (التوجيهات الأوروبية من أجل الاستخدام المعزول للكائنات المجهرية المعدلة وراثياً، (genetically modified microorganisms GMMs)؛ حيث تنفذ كل دولة في الاتحاد هذه التوجيهات في نظامها التشريعي. ففي المملكة المتحدة، تغطي القوانين جميع الكائنات، وليس فقط الكائنات المجهرية. كما تقوم مؤسسة الصحة والأمان (Health and Safety Executive (HSE)) بفرض وتطبيق القانون في المملكة المتحدة الذي يضبط أمان النشاطات المُتَضَمِّنة كائنات معدلة وراثياً ضمن شروط الاحتواء (العزل) (تنظيمات توجيهية لاستخدام الكائنات المعدلة وراثياً (الاستخدام المعزول) 2000). تصنف الكائنات المجهرية المعدلة وراثياً (GMM) ضمن أربعة أصناف بالاعتماد على تقدير الخطر. وعندما تقع قياسات السيطرة المقدرة بين مستويين للعزل، يتوجب تصنيف النشاط ضمن المستوى الأعلى. كما يجب إعلام الـ HSE ببعض النشاطات التي تنطوي على كائنات معدلة وراثياً.

العاملون المدربون (Trained personnel). يجب على أفراد فريق العمل كاملاً الذين يقومون بتنفيذ التجارب الوراثية أن يكونوا مدربين مهنياً على قدرٍ كافٍ، وأن يتلقوا دورياً تعليمات رسمية إضافية. كما يكون مدير المشروع مسؤولاً عن التنفيذ الاحترافي لجميع التجارب وعن توثيقها. في بعض البلدان، يجب تعيين ضابط أمان أحيائي لكل مختبر أو لعدة مختبرات الذي، باسم الضابط التنفيذي المركزي للمعهد، يشرف على الحالة الفنية للمختبرات ويتشاور مع مدراء المشاريع.

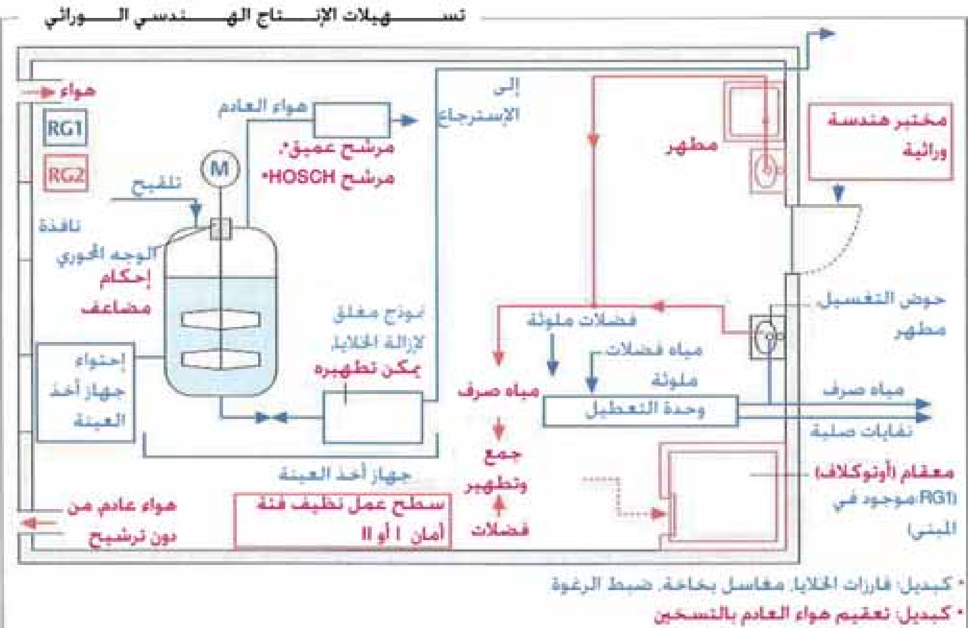
تجهيز المختبرات (Laboratory equipment). يجب أولاً مسح المختبرات المستخدمة في الهندسة الوراثية بواسطة المكتب التنظيمي المسؤول، التي يجب إنشاؤها بعلم وخبر الجهات التشريعية وأن تتم الموافقة عليها. واعتماداً على التجارب التي ستجرى فيها، يجب أن تلتزم هذه المختبرات بتحقيق مستويات الأمان الحيوي أو الاحتواء المختلفة ((biosafety levels (BSL))، ويجب أن تتواءم مواصفات تشييد البناء فيها مع هذه المقاييسات (مثل سطوح عمل نظيفة مزودة بضغط سلبي، وأقفال). تتزايد متطلبات التخلص من مياه الصرف، والهواء العادم والفضلات مع تزايد مستويات الأمان. وهو أمرٌ يتعلق أيضاً بالتفتيشات الصحية. ففي ألمانيا، مثلاً، يجب على جميع العاملين الذين يستخدمون عوامل تتبع مجموعة الخطورة الثانية (RG2) وأعلى الخضوع لفحوص طبية دورية. إضافة إلى ذلك، تخضع المرافق الخاصة بإنتاج المنتجات المؤشبة (recombinant) لإجراءات أكثر حزماً. وفي بعض البلدان، يدعى العامة للمساهمة في تسجيل معامل الإنتاج بدءاً من المستوى RG2.

التوثيق (Documentation). عموماً، يجب إعلام المكتب التنظيمي ببدء عمل مختبر الهندسة الوراثية، كما يجب أن يكون هذا المختبر مسجلاً. في هذه المختبرات يلزم توثيق جميع التجارب. ففي ألمانيا، تحفظ المستندات المتعلقة بمجموعة الخطورة 1 (RG1) لمدة 10 سنوات؛ بينما تحفظ تلك المتعلقة بعوامل تتبع لمجموعة الخطورة 2 (RG2) أو أكثر لمدة 30 عاماً.

مخـــــتبر الهنــدســــة الـــــوراثيـــــة RG2 وRG1 (طبـــقاً للقـــوانيـــن الألـــــانية)



تســـــهيلات الإنـــتاج الهـــندسي الـــوراثي



تقـــييم خطـــــورة الكـــائنات المجـــهرية المهـــــندسة وراثـــــياً

	الخطورة على الإنسان والبيئة	أمثلة
RG1	لا خطورة	سلالات مخبرية مثل الـE.coli، خميرة الخباز النباتات والحيوانات المحورة وراثياً
RG2	منخفضة	بعض سلالات الـPseudomonas، والـXanthomonas
RG3	متوسطة	Micobacterium tuberculosis، فيروسات النباتات
RG4	عالية	الكائنات المجهرية المرضة جداً للإنسان

• تنظيم المنتجات المتحدرة من التقانة الحيوية

(Regulation of products derived from biotechnology)

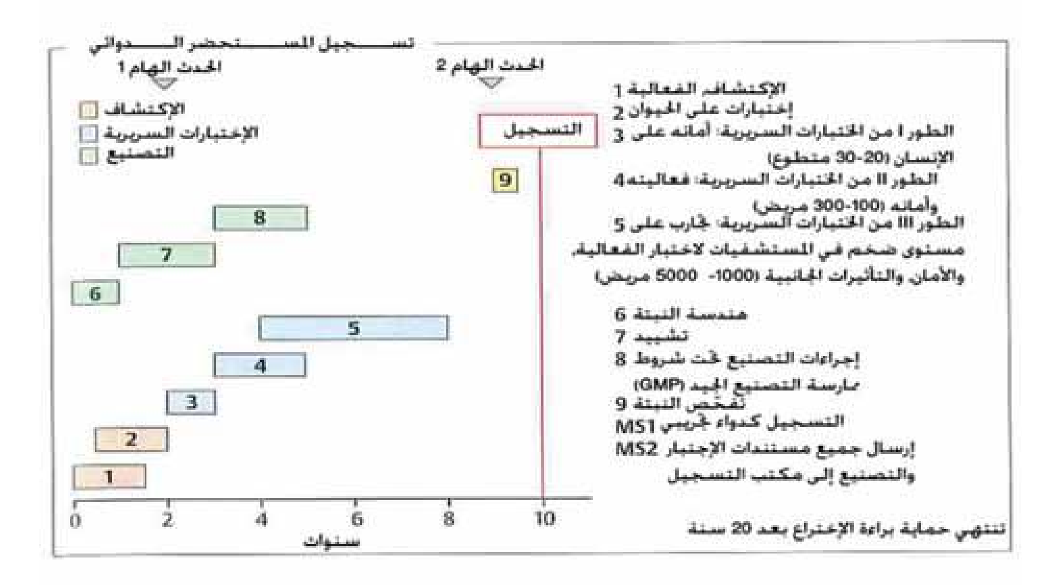
عموميات (General). ينظم تصنيع وبيع المنتجات المهندسة وراثياً بمجموعة معقدة من الأنظمة المعدة لخدمة أمن المستهلك والبيئة. على الرغم من الاختلافات في التنظيمات الوطنية، فإن هذه القواعد متشابهة في أغلب البلدان. ولكون الولايات المتحدة هي الرائدة في مجال الهندسة الوراثية، فإن هذه الدراسة تركز على التنظيمات المتخذة في هذا البلد. إن أغلب التنظيمات تصدر عن قسم الزراعة (USDA) (الزراعة، الاختبارات الحقلية)، وكالة حماية البيئة ((Environmental Protection Agency (EPA) (مبيدات الحشرات، الكائنات المجهرية المعدلة وراثياً)، وإدارة الغذاء والدواء (Food and Drug Administration (FDA)) (منتجات غذائية والإضافات والمستحضرات الدوائية الحيوية).

تسجيل المركبات الدوائية (الحيوية) (Registration of a (bio) pharmaceutical). تسجل المنتجات الصيدلانية بواسطة السلطات الصحية العليا للبلد، في الولايات المتحدة، عبر إدارة الغذاء والدواء (Food and Drug Administration (FDA)). ولتسجيل عقار ما، يجب تقديم الوثائق التالية: 1) بيانات شاملة عن فعاليته وأمانه، 2) توثيق دقيق لعملية التصنيع بمواقع مرخصة (ISO 9001)، و3) وثائق تؤكد الاستمرار في مراقبة الجودة. يبدأ عادة إجراء التسجيل بمرحلة ما قبل سريرية (preclinical phase)، حيث تُختَبر الفعالية والأمان في مختبرات البحث العلمي وبتجارب على الحيوانات. وفي حالة الحصول على نتائج إيجابية، عندئذٍ تبدأ عملية تصنيع الدواء ويعطى حالة دواء تجريبي، بحيث يدخل بحلقة من الاختبارات السريرية على البشر. أولاً، يجري اختبار أمن العقار على مجموعة صغيرة من الأصحاء المتطوعين (مرحلة سريرية I). ثم يُتبع باعتماد الفعالية والأمان على مجموعات من المرضى (مرحلة سريرية II). وعند الحصول على نتائج جيدة وواعدة، يجري اختبار فعالية وأمن والأعراض الجانبية للدواء على مجموعات كبيرة من المرضى (مرحلة سريرية III). بعد ذلك، يجب تسليم جميع البيانات عن هذه الإجراءات إلى الـ FDA، التي بدورها تقرر إمكانية تسجيل الدواء أو طلب اختبارات جديدة. تتطلب هذه العملية 11 سنة للأدوية الكيميائية، ولكن 9 سنوات فقط للأدوية الحيوية، بمعدل سعر يتجاوز 100 مليون دولار (يصل فقط دواء واحد من أصل 50000 مرشح قبل سريري مرحلة التسجيل). وبالتوازي مع مراحل التسجيل، يتم ضبط وأمثلة وتوثيق عملية التصنيع. ولدى إنتاج المنتج من الضروري إثبات خلوّه من الملوثات الكيميائية والوراثية والعوامل الممرضة. وهو ما يتطلب تدقيقاً شديداً في مراقبة الجودة من حيث الهواء، والماء، ومادة البدء، وشروط التخزين خلال التصنيع. كما يجب خلال عمليات التخمير التأكد من خلو الملوثات الحيوية (السموم الفطرية، الفيروسات القهقرية (retroviruses)، . . . الخ).

المنتجات الزراعية (Aggriculture products). منذ عام 1990، صرح الجهاز التنظيمي للولايات المتحدة الأمريكية لأكثر من 25 منتجاً تقانياً حيوياً زراعياً بالتسويق، مثلاً، في عام 1996، رخصت وكالة الـ EPA باستخدام بكتريا *Bacillus thuringiensis* المعدلة وراثياً كمبيد زراعي. وفي عامي 1990 و1994 على التوالي، أقرّت الـ FDA الاستخدام التجاري للكيموسين المؤشب (recombinant chymosine) (مادة الرينين (rennet)) في صناعة الجبن، وتسويق بندورة FlavrSavr™. كما سمحت، في السنوات القليلة الماضية، إدارتا الـ FDA وUSDA بالاستخدام التجاري للذرة والقطن والبطاطا المؤشبة المقاوِمة للحشرات؛ واللفت الزيتي والقطن وفول الصويا والذرة المتحملة لمبيدات الأعشاب؛ والبندورة بطيئة النضج؛ واللفت الزيتي المعدل تركيبه من الزيت.

المنتجات الغذائية والإضافات (Food products and additives). يمكن الحصول على هذه المنتجات بخطوات التخمير أو بواسطة التعديل الوراثي. وتشمل الفواكه والخضار واللحم والسمك المحوّرين وراثياً والمنتجات الأساسية مثل الطحين، السكر أو الحليب المنتجة من كائنات محورة وراثياً. من جهة أخرى، تضم الإضافات الغذائية المحضرة بالتخمير الأنزيمات، المثخنات كالدكستران (dextran) أو صمغ الكزنثان (xanthan)، والمركبات العطرية والملونات (الأصبغة). في الولايات المتحدة الأمريكية، ومنذ عام 1996 لم توسم أي من المنتجات المذكورة أعلاه. إلا أنه يتطلب التشريع الأوروبي لعام 1997 بأن يكون على الأغذية الجديدة ومكوناتها وسماً واضحاً على علب الأغذية التي تحوي كائنات معدلة وراثياً أو البروتين أو الـ DNA الخاص بهذه الكائنات. إلا إنه لا حاجة للوسم في المنتجات التي صنعت بكائن معدل وراثياً بحيث لا يتواجد هذا الكائن في المنتج النهائي.

المستحضرات الدوائية الحيوية				
	تحت التطوير (عام 2000)	مسجلة (عام 2000)	%	المعدل الزمني للتسجيل
أدوية تقليدية	1000	27	2.7	11.3 سنة
مستحضرات دوائية حيوية	369	32	8.7	7.8 سنة



معايير التسجيل	
الفعالية	التأثيرات مثبتة وذات أهمية على صعيد الاقتصاد الوطني*
الأمان	بالاعتماد على التجارب السريرية وعلى الحيوانات، يمكن تقدير التأثيرات الجانبية، وهي منخفضة مقارنة بالفعالية
أمانية التصنيع	مقايسة عملية التصنيع وإخضاعها لقواعد ممارسة التصنيع الجيد (GMP). التحضير خالي من مركبات جانبية، عوامل مسببة للحمى، فيروسات، بكتيريا و DNA معدي
أخرى	السعر يتناسب مع الفائدة
* باستثناء الأدوية اليتيمة (الأدوية الفعالة ضد أمراض نادرة)	

الأنزيمات كإضافات غذائية: شروط التسجيل	
توصيات JECFA	
أنزيمات مستخلصة من الحيوانات أو النباتات	اختبارات سمّيّة غير مطلوبة
أنزيمات من كائنات مجهرية GRAS	اختبارات سمّيّة محدودة (سمية حادة)
أنزيمات من كائنات مجهرية أخرى	اختبارات سمّيّة مزمنة
أنزيمات من كائنات مجهرية ممرضة	غير مسموحة
GRAS = معترف بأمنها بشكلٍ عام (generally recognized as safe) JECFA = لجنة الخبراء المشتركة بين الـ FAO و WHO للإضافات الغذائية (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)	

الاعتبارات الأخلاقية والقبول

(Ethical considerations and acceptance)

عموميات (General). لقد أثارت جوانب متنوعة من الهندسة الوراثية وعلم الأحياء الخلوية العديد من التساؤلات الفلسفية العلمية والأخلاقية. وهي تشمل: 1) كيفية حماية المعلومات الوراثية للشخص، 2) كيفية تبرير العلاج الجيني، خصوصاً في الخلايا أحادية الصيغة الصبغية (خط البذرة (germline)) التي تقود إلى صفات متوارثة، 3) كلونة ـ استنساخ ـ (cloning) أجنة البشر، 4) العلاج بالخلايا الجذعية، و5) سلامة وخير الحيوان، مثلاً، الحيوانات منقوصة جين محدد (knockout) المستخدمة في تطوير الأدوية وإنتاج المستحضرات الدوائية الحيوية في الحيوانات المحورة وراثياً، و6) الاستخدام العسكري للتقانة الحيوية والهندسة الوراثية. وعلى الرغم من أن التقانة الحيوية الحديثة مقبولة اجتماعياً من حيث المبدأ، إلا أنه يبقى من الضروري أن ترجح كفة المنافع على كفة المخاطر.

المعلومات الوراثية الفردية (Individual genetic information). من فوائد الغربلة الوراثية، خصوصاً بعد الانتهاء من سَلسَلة الجينوم البشري، جعل إمكانية التنبؤ باستعداد الفرد تجاه الأمراض الوراثية في المستقبل أمراً معقولاً، مثل، من خلال تشخيص الأهل. وقد أثار هذا الموضوع التساؤل حول كيفية تعامل الأطباء والمجتمع مع هذه المعلومات (مثلاً، هل يجوز الإجهاض إذا ما كان الجنين يظهر استعداداً وراثياً لتطوير مرض مستعصي؟). كما يجب أن نقرر الحد الذي تتوقف عنده المؤسسات الحكومية عن تخزين البيانات الوراثية الفردية بغرض، مثلاً، الغربلة السريعة خلال التحريات الجنائية، أو فيما إذا كان مسموحاً لشركات التأمين وأرباب العمل الاطلاع على هذه البيانات لموازنة التأمين أو التوظيف ضد المخاطر الصحية.

العلاج الجيني (Gene therapy). في المجتمع الديمقراطي، يعتمد العلاج الجيني الجسمي (للخلايا الجسمية) على الموافقة المستنيرة للمريض، وهو ذي مخاطر قليلة. إلا أنه، إذا ما تم تطبيق العلاج الجيني على خلايا البويضة أو الحيوان منوي وحيدة الصيغة الصبغية (haploid)، فإن نماذجاً وراثية معدلة ربما تورث إلى النسل دون موافقته المستنيرة. إن التقنيات الضرورية للعلاج الجيني تتطور في الاختبارات الحيوانية بسرعة، ولكن لا يزال قبولها ونجاحها في المعالجة عند الإنسان أمراً غامضاً إلى حدٍ الكبير.

التلاعب الوراثي (Gene manipulation). نادراً ما يلقى استخدام الكائنات المجهرية في إنتاج أو تحويل المواد الكيميائية الدقيقة جدلاً، حتى لو تضمن تقنيات للتلاعب بالـ DNA. وبالنسبة إلى النباتات المهندسة وراثياً، فتتركز الاهتمامات على الأسئلة المتعلقة بأمن الأغذية التي نحصل عليها من مثل هذه النباتات، وإذا ما كان ممكناً التحكم بنتائجها البيئية الناجمة عن زراعتها على المدى البعيد. بالمقارنة، يثير التلاعب الوراثي عند الحيوانات قلقاً أكبر عند العامة. بينما تلعب أهداف التجارب على الحيوانات المحورة وراثياً (إنتاج المستحضرات الدوائية، استخدام حيوانات منقوصة جين (knockout) محدد في البحث الدوائي) دوراً ضئيلاً في هذا القلق.

الأنسال البشرية والحيوانية (Animal and human clones). بعد إنتاج أنسال متطابقة من النعاج، الفئران، الخنازير، الأبقار والماعز، لاقى الاستنساخ الإنجابي للبشر مناقشات أخلاقية أساسية حيث تضمنت هذه المناقشات التبعات الوراثية على المجتمعات لتقنيات مثل تحديد جنس النسل أو التخصيب بالزجاج ونقل الأجنة.

العلاج بالخلايا الجذعية (Stem cell therapy). تتمحور نقطة النقاش الأساسية حول المرحلة التطورية للإنسان التي تبدأ فيها الحياة وحتمية حمايتها وإذا ما توافرت خيارات علاجية أخرى يمكن تطويرها، مثل، إكثار وتمايز الخلايا الجذعية لدى البالغ.

الاستخدام العسكري أو الإرهابي (Millitary and terrorist use). يمكن استخدام إجراءات التقانة الحيوية لإنتاج عوامل تستخدم بالحروب، مثل أبواغ بكتريا *Bacillus anthracis* أو فيروس الجدري. كما يمكن استخدام تقنيات الهندسة الوراثية لتطوير أسلحة بيولوجية تتجاوز آليات الدفاع الموجودة لدى الجهاز المناعي. يشك، وعلى الرغم من عدم شرعية الأسلحة البيولوجية حسب ميثاق جنيف، بأن العديد من الدول تقوم بإنتاجها.

تقبل العامة (Public acceptance). يبدي العموم في الولايات المتحدة الأمريكية، وهي الدولة التي تقود أغلب التطورات في الأبحاث الوراثية وتقانة الجينات (يجري 2/ 3 من جميع تجارب العلاج الجيني في الولايات المتحدة الأمريكية) تحفظات أقل من نظرائهم في اليابان وأوروبا. وفي أغلب الدول يلقى الاستخدام الطبي للتقانة الحيوية والهندسة الوراثية موافقة ودعماً شعبياً. بينما يواجه إنتاج الحيوانات المحورة وراثياً نقداً شعبياً واسعاً في أوروبا، على الرغم من أن الفئران المحورة وراثياً قد أصبحت أداة قياسية في البحث الطبي الحيوي. أما النباتات المحورة وراثياً فتلقى حماساً قليلاً لدى الشعوب الأوروبية، ولكنها محاصيل رئيسية في أمريكا وكندا، ولها أهمية متزايدة في بلدان مثل الصين. كما تستخدم الأنزيمات المعدلة وراثياً بشكل واسع في التقانة وتقانة الغذاء، بدون اعتراض شعبي كبير.

الجـــــدال الفلـــــسفي-العلـــــمي حـــــول الـــــهندسة الـــــوراثية

الخلاف الصريح أو المطلق

يجب تجنب بعض النشاطات البشرية مثل الهندسة الوراثية، وذلك بشكلٍ أساسي. إن تطوير هذه التقانة، "الإنسان يلعب دور الإله" والإدعاء بالكفاءة إلى ما بعد قدراته بحيث يعمل على تحطيم البيئة وهدمها

الخلاف العلمي

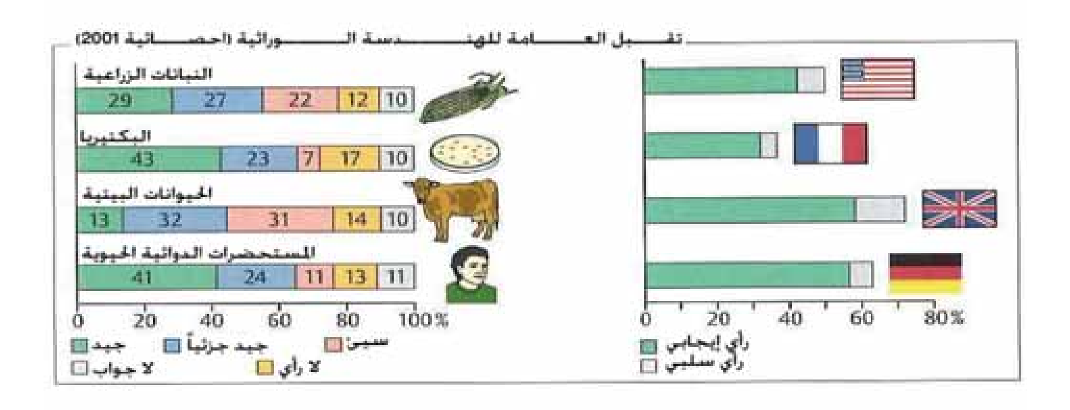
إن الهدف الأساسي للهندسة الوراثية هو تقليل معاناة المرضى. إلا أنه يجب أن تكون الاجراءات المطبقة آمنة ويجب أن يكون بإمكان المريض أخذ القرار فيما إذا كان يرغب بالتشخيص الوراثي أو المعالجة

خلاف سياسة المجتمع

لا يمكن تقدير التأثيرات الاجتماعية للهندسة الوراثية. في المعالجة الوراثية، يتم اختيار أولويات خاطئة، في حين أن الوقاية أفضل ومرغوبة أكثر. لقد دخلنا منحدراً زلقاً سيقودنا لاإرادياً إلى ممارسات لا إنسانية مع الجيل التالي ("تحسين نسل مقلوب")

الجوانب الجدلية في البحث الوراثي

الموضوع	تقدم التقنية	الرقابة أو التوجه
استنساخ الإنسان	استنساخ الحيوانات ممكن	غير مسموح
استخدام الخلايا الجذعية الجنينية	خبرة تنمو	مسموح، ولكن برقابة
التلقيح الإصطناعي، تحديد الجنس، الأمهات البديلات	تقنية متقدمة في الحيوان	التلقيح الإصطناعي مسموح، أما تحديد الجنس والأمهات البديلات فممنوعة
التشخيص ما قبل الولادة	نشأت طرائق الفحص على مستوى الخلايا، أما التشخيصات المعتمدة على الـDNA فقد نشأت بشكلٍ جزئي	مسموح، الإجهاض مسموح بعد الدلالة الطبية
تحديد المخاطر الوراثية بالغربلة الوراثية	ممكنة في حالات الأمراض الوحيدة الموروث	موضوع نقاش في حالة توقع وجود خلل بجين واحد وإذا كان التشخيص مقبولاً لمداواة الأمراض العضال؛ فمن المطلوب حماية قوية للبيانات تجاه أصحاب العمل، وشركات التأمين.
إنقاص جين محدد لدى الحيوانات من أجل الأبحاث	نشأت بشكل واسع	عموماً مقبولة، ولكنها تلقى معارضة شديدة من مجموعات حماية الحيوان.
إنتاج الأغذية والمستحضرات الدوائية الحيوية باستخدام الحيوانات أو النباتات المحورة وراثياً	نشأت تقنيات عديدة	تجري مناقشتها في ظل حماية المستهلك، حماية الحيوان، والتبعات على البيئة
الكائنات المجهرية أو الخطوط الخلوية لإنتاج المستحضرات الدوائية الحيوية	نشأت	مقبولة بشكلٍ واسع



• براءات الاختراع في التقانة الحيوية

(Patents in biotechnology)

عموميات (General). تستطيع الحكومات في جميع الدول الصناعية، عبر مكاتب البراءات، منح المخترعين حقوقاً حصرية لمدة محددة من الزمن، التي عادة ما تكون عشرين عاماً. هناك أنواع مختلفة من حقوق حماية الملكية الفكرية، مثل البراءات أو النماذج التصنيعية الخاصة بالاستخدام التجاري وتصنيع المواد، والعمليات المستخدمة في تصنيعها، واستخداماتها اللاحقة. لمنح براءة اختراع، يجب أن يكون الاختراع جديداً، مبتكراً، وقابلاً للتطبيق. لذلك، يجب في **البراءات الخاصة بالمنتجات أو المركبات** أن تكون المادة الموصوفة بالاختراع، مثل المركب الكيميائي، المزيج أو قطعة من التجهيزات جديدة ومبتكرة وذات قيمة اقتصادية. وينطبق الأمر ذاته على **براءات التصنيع**، التي تعتمد على الأمور الأساسية الثلاثة المذكورة بالإضافة إلى توصيف الاختراع بطريقة تمكن الخبير في هذا المجال من القيام بها بدون عوائق مفرطة. أما الاكتشافات، والنظريات العلمية، والطرائق الرياضية والاختراعات الفنية فلا تمنح البراءات. كذلك الأمر بالنسبة إلى البرمجيات أو طريقة تنفيذ العمل مثل، الطرائق العلاجية، التشخيصية أو الجراحية للإنسان والحيوان. غير أن المركبات الدوائية وخلائطها يمكن أن تُسَجَّل كبراءات اختراع. كما لا تمنح حقوق ملكية فكرية على اختراعات مخالفة للنظام العام أو الأخلاقيات.

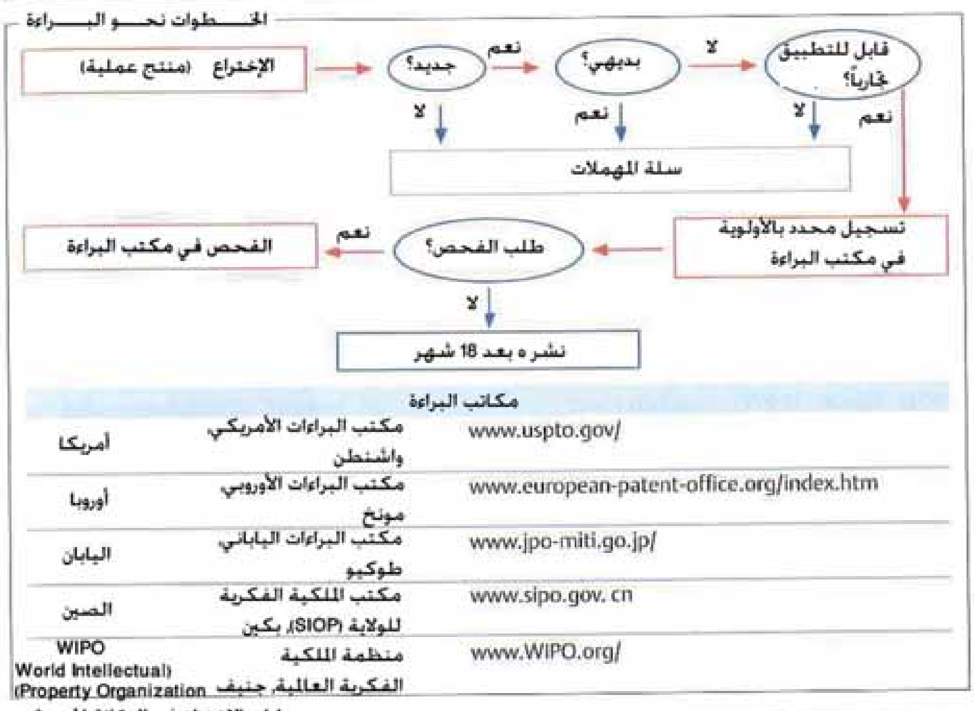
عملية تسجيل البراءة (Patenting process). يمكن رفع طلب البراءة، الذي يكتبه في حالات كثيرة محامو البراءة، إلى مكتب البراءة بواسطة شخص شرعي. ثم خلال 6 أشهر من نشر طلب البراءة الأوروبي يجب رفع طلب الفحص. عندها يتم تحليله بواسطة خبير منح البراءة. ليتم بعدها نشر النص الموجود بطلب البراءة بواسطة مكتب البراءات بعد 18 شهراً من التسجيل الأوّلي. ثم يتبعها إجراءات أخرى، بحيث تمنح البراءة بعد 4 إلى 5 سنوات من الإيداع. بعد منح البراءة، يمكن لطرف ثالث أن يعترض خلال مدة تصل إلى 9 أشهر. إن التاريخ الأولي في معظم البلدان هو تاريخ تسليم الطلب إلى مكتب البراءات (أولاً ليُرفع first to file)، لكنه في الولايات المتحدة يكون تاريخ توثيق الاختراع (أولاً ليخترع first to invent)، على سبيل المثال، دليلاً على الاختراع في مجلة مخبرية. يمكن في الولايات المتحدة الأمريكية واليابان تسليم البراءات خلال 12 و6 أشهر على التوالي بعد نشر الاختراع (فترة الامتياز period grace)؛ وتبعاً «لميثاق البراءات» الأوروبي، يمنع أي نوع من أنواع النشر الآنف إعطاء حق البراءة وتسجيلها. بعد منح البراءة، تبقى البراءات صالحة حتى 20 سنة من تاريخ التسجيل إذا استمر دفع الرسوم المترتبة عليها. تتراوح تكلفة طلب البراءة من 1000 إلى 10000 € أو أكثر، كما أن متابعتها وصيانتها وتطبيقها مرتفع الثمن. ولمنع تكاليف الترجمة المرتفعة لدى مكاتب البراءات الأجنبية، يمكن لطالب البراءة رفع طلب البراءة تبعاً لمعاهدة PCT بإحدى اللغات الرسمية السبع. بعد صدور تقرير الفحص الأولي على قابلية منح البراءة اعتماداً على الطلب المقدم، يستطيع مقدم طلب البراءة متابعة الطلب في أكثر من 110 بلدان يعتمد معاهدة PCT، الذي يتطلب ترجمة نص طلب البراءة إلى لغات الدول التي اختارها مقدم الطلب.

البراءات في التقانة الحيوية (Ptents in biotechnology). تعتبر المواد المعزولة من الكائنات الحية أو المصنعة بواسطة عمليات التقانة الحيوية قابلة للتسجيل كبراءات اختراع تحت الشروط المذكورة أعلاه. كما يمكن أيضاً تسجيل الكائنات الحية، خاصةً المُرَباة لأهداف اقتصادية، كبراءات اختراع، مثل سلالات الإنتاج الميكروبي أو خطوط الخلايا، الحيوانات والنباتات المعدلة وراثياً، ولكن ليس المواد الوراثية. ربما يتطلب تنفيذ موضوع البراءة من قبل شخص محترف إيداع عينة من الكائن الضروري لعملية التصنيع الخاصة بالمنتج بمعهد الإيداع (1965، معاهدة بودابست). وللطلبات المتعلقة بالبروتينات أو المنتجات الخاصة بالـ DNA، فإن المعلومات الخاصة بتسلسل الحمض الأميني أو الحمض النووي تعتبر كافية. كما يمكن تسجيل الجينات المطفرة أو البروتينات أو بالـ DNA المتعدد الأشكال (polymorphic) كبراءات اختراع. إلا أنه لا يمكن تسجيل التسلسلات الجينية لعلامات التسلسل المعبر عنه ((expressed sequence tags (ESTs)) كبراءات اختراع طالما لا يوجد كشف عن صفاتهم الخاصة.

أمثلة من التقانة الحيوية

براءات العمليات		براءات المواد	
العمليات	عزل الـDNA، تصنيع الـDNA، تحضير النواقل، عمليات تنقية البروتينات	المواد	الجينات المكلونة، البروتينات المؤشبة، الأجسام المضادة وحيدة النسيلة، البلازميدات، المحضضات، النواقل، تسلسلات الـDNA المتمم، اللقاحات احادية التكافؤ
بروتوكولات العمليات	معايرات التهجين، اجراءات التشخيص، طرائق الـ PCR، تحليل الطفرات	مزائج المواد	اللقاحات متعددة التكافؤ، المبيدات الحشرية الحيوية، مستحضرات دوائية، الكائنات المجهرية، الحيوانات والنباتات المحورة وراثياً
التطبيقات	تطبيقات المبيدات الحشرية الحيوية، اجراءات التخمير للكائنات المجهرية المعدلة وراثياً	المعدات	جهاز الهجرة الكهربائية بالهلامة، جهاز سلسلة الـDNA، المدفع الجيني

الخـــــطوات نحـــو البـــــراءة



مكاتب البراءة		
أمريكا	مكتب البراءات الأمريكي، واشنطن	www.uspto.gov/
أوروبا	مكتب البراءات الأوروبي، مونخ	www.european-patent-office.org/index.htm
اليابان	مكتب البراءات الياباني، طوكيو	www.jpo-miti.go.jp/
الصين	مكتب الملكية الفكرية للولاية (SIOP)، بكين	www.sipo.gov. cn
WIPO (World Intellectual Property Organization)	منظمة الملكية الفكرية العالمية، جنيف	www.WIPO.org/

براءات الإختراع في التقانة الحيوية

	العالم 1990	العالم 2000	أمريكا 1990	أمريكا 2000	ألمانيا 1990	ألمانيا 2000	بريطانيا 1990	بريطانيا 2000	فرنسا 1990	فرنسا 2000	اليابان 1990	اليابان 2000	الصين 1990	الصين 2000
الوراثة الجزيئية	2830	15117	1275	8530	225	947	164	847	128	571	636	1634	3	362
التخمير	3581	3288	705	746	408	312	130	116	115	100	1632	1219	36	162
المستحضرات الدوائية	11297	23533	3341	10026	1210	1926	671	1244	703	1060	3216	4309	56	692

البيانات من Chemical Abstrats (CAS) المتاحة على الشبكة العالمية، الجزء 3 "Biochemical Genetics"، الجزء 16 "Fermentation and Bioindustrial Engineering"، والجزء 63 "Pharmaceuticals". لا تشير بالضرورة الدولة المختارة بواسطة الشركة المترجمة للإيداع الأولي لطلبات البراءة إلى مكان نشوء الاختراع

• هيئات التقانة الحيوية الدولية

(International aspects of biotechnology)

عمـوميـات (General). نـتـجـت، كـمـا فـي مـعـظـم الخروقات العلمية والتقنية في تاريخ البشرية، التقانة الحيوية والهندسة الوراثية من مجموعة متنوعة من المساهمات لبلدان عديدة. وفي أغلب الأحيان، ساعدت القفزات الكمية في البحث الأساسي أو الأزمات الاقتصادية على السير قُدُماً في مجال التقانة الحيوية؛ وإن هذا صحيح تماماً في تطور الصناعات التخميرية في أوروبا واليابان. على أية حال، فإنه من الواضح أن الهندسة الوراثية هي من بنات أفكار الولايات المتحدة الأمريكية. فقد بدأ منذ حوالى عام 1971، العديد من المؤسسين الأكاديميين في أمريكا تأسيس شركات، جذبت في حالات كثيرة الرأسمال المغامر الخاص، لتباع أخيراً إلى الشركات الصيدلانية الكبيرة أو لتنمو وتشكل شركات مستقلة ضخمة. في الوقت الراهن، يتواجد أكثر من 1400 شركة حيوية تعتمد على الرأسمال المغامر في الولايات المتحدة الأمريكية وأوروبا، وحوالى 100 شركة في اليابان، تركز على التقانة الحيوية، الهندسة الوراثية والمعلوماتية الحيوية.

الـولايـات الـمـتـحـدة الأمـريـكـيـة (USA). كـانـت أولـى الـشـركـات الـمـؤسـسـة حـول الـوراثـة الـجـزيـئـيـة شـركـة Cetus (1971)، Genex (1972)، Genentech (1976)، Biogen (1978) وAmgen (1980). وكـان الدافـع الأساسي عادةً تقنية جديدة مرسَّخة ببراءات اختراع (مثلاً، لشركـة Genentech، التعبير المتغاير الأصل (heterologous) للجينات تبعاً لبراءة Cohen-Boyer). نجحت بعض هذه الشركات، بينما لا تزال تدعم مالياً بواسطة الرأسمال المغامر، في الاختراع وتسجيل عدد كبير من البراءات خلال بضع سنوات فقط. فقد حصلت شركة Genentech على براءات لإنتاج الإنسولين البشري في بكتريا *E. coli* (1976) والعامل البشري VIII (1978) والـ TPA البشري (1980) في خلايا حيوانية. وقادت عوائد التراخيص لهذه البراءات، إلى حد ما، الجهود التسويقية إلى زيادة هامة في العائد وقيمة السهم. في عام 1992، ضمت شركة Roche السويسرية 70٪ من أسهم Genentech بقيمة 3 بليون دولار؛ وبعدها بقليل اشترت Cetus ببراءاتها العالمية على تفاعل الـ PCR. إلا أنه اليوم، لا يزال عدد الشركات الناجحة قليل مقارنةً بالرأسمال المستثمر. تشكل شركات الدواء العملاقة مـــثـــل Novartis، Roche، Aventis، Glaxosmithkline، Merek، Bayer، Pfizer، Bristol-Myers Squibb، . . . الخ، مراكز للأبحاث والتطوير؛ حيث تستخدم الإمكانية الكبيرة لأبحاث الجينوم وما بعد الجينوم لتطوير أدوية جديدة مناسبة لسياساتهم التسويقية، التي يقع العديد منها في الولايات المتحدة الأمريكية.

أوروبا

مع بداية الهندسة الوراثية، كانت معظم الشركات الأوروبية بطيئة في إعداد مختبراتها البحثية الخاصة في هذا المجال، كما تطورت الشركات المغامرة ببطء أيضاً. أما الآن فقد اقتربت أوروبا من اللحاق بالولايات المتحدة الأمريكية، كما يتم تأسيس عدد متزايد من الشركات المتوسطة والصغيرة الناجحة في معظم البلدان الأوروبية بحيث تتشارك المملكة المتحدة وألمانيا المرتبة الأهم على الصعيد الأوروبي. وعلى الرغم من أن عدد شركات التقانة الحيوية في أوروبا يزيد على مثيله في أمريكا (مع نهاية عام 2001، هناك 1879 شركة تقانة حيوية بأوروبا مقابل 1457 في أمريكا، ويشكلان مع بعضهما بعضاً أكثر من 60٪ من العدد العالمي، 4284)، فإن الشركات الأمريكية تشغل تقريباً ضعف عدد العاملين، وتمتلك حوالى ثلاث أضعاف المبيعات و10 أضعاف المنتجات الدوائية في الاختبارات السريرية للطور III.

اليابان (Japan)

يندر وجود الشركات العاملة بالرأسمال المغامر، ولكن جميع الشركات الكبيرة تقريباً تقوم بدعم مجالات الهندسة الوراثية وعلم الأحياء الخلوية بشكلٍ كبير. وعلى الرغم من ذلك، فإن عدداً قليلاً فقط من الشركات التي اتجهت نحو هذه الأعمال قد لاقت النجاح، منها شركتا Suntory وKirin Beer.

الابـــتـــكـــار والأداء (Innovation and performance). نشأت معظم الابتكارات التي ساعدت على تقدم شركات التقانة الحيوية في البلدان الصناعية في أوروبا، اليابان وبشكل متزايد الصين والولايات المتحدة الأمريكية قبل الجميع. وإذا ما أخذ بالاعتبار معيار النشر العلمي في مجالات أساسية كالوراثة الجزيئية وعلم الأحياء الخلوية، فإن الولايات المتحدة الأمريكية تساهم بحوالى 40٪ من النشر العالمي.

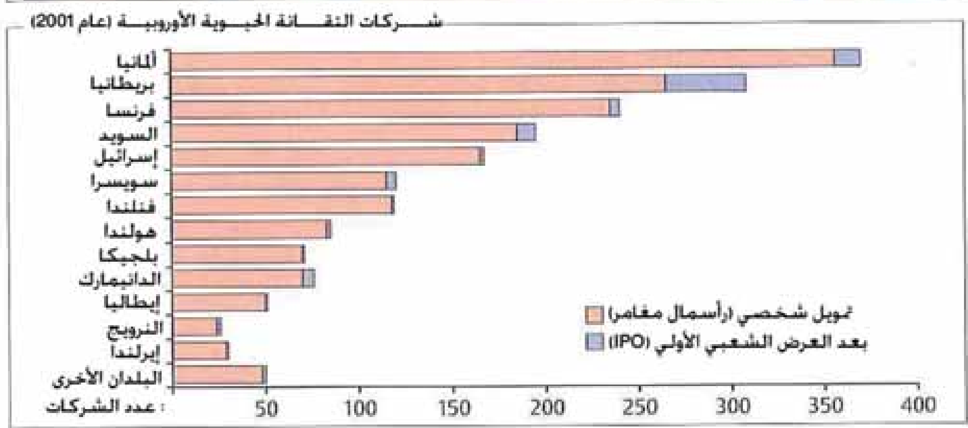
البرامج الحكومية (Governmental programs). يتم دعم تطور التقانة الحيوية، كأحد التقانات الكبيرة للقرن 21، في جميع البلدان الصناعية وأيضاً في العديد من البلدان النامية مثل الصين. كما يلعب تطوير الكفاءات الأساسية وتدريب العاملين أدوراً هامة. ويعتبر تدريب العقول الشابة الابتكارية من المهام الأساسية لمواجهة التحديات الخاصة بالتقنيات الجديدة المتعددة الأنظمة والمحاور التي تتضمن علم الأحياء، الكيمياء، البيئة، الهندسة والمعلوماتية، وأخيراً ولكن ليس آخراً، الاقتصاد.

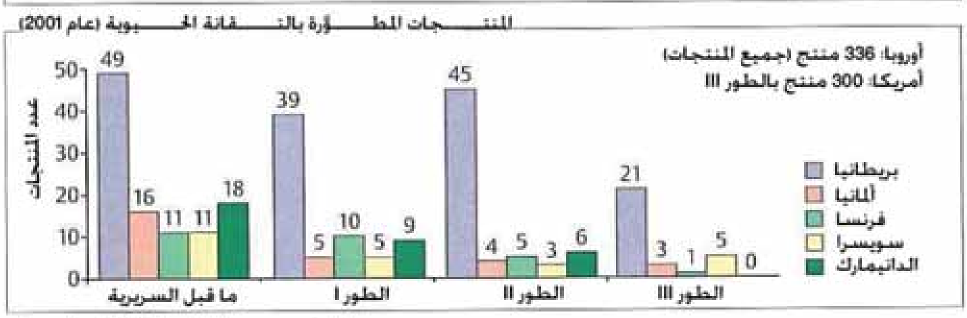
مقارنة عالمية للأداء- النشر في الملخصات الكيميائية، عام 2000

	الصين	اليابان	فرنسا	بريطانيا	ألمانيا	أمريكا	العالم
الوراثة الجزيئية	2911	7480	2646	3716	3706	22140	55834
التخمير	998	1710	220	308	528	1202	7499
المستحضرات الدوائية	2105	6042	1471	1890	2618	12706	35469

أداء شركات التقانة الحيوية

	أوروبا 2001	أوروبا 2000	أمريكا 2001	أمريكا 2000
عدد الشركات الإجمالي	1879	1734	1457	1379
الشركات العامة	104	107	342	344
الموظفين (×1000)	87	67	107	130
نفقات البحث والتطوير (R&D) (بليون $ أو يورو)	7.5	5.5	15.7	14.7
% للشركات العامة	4.2	2.9	11.5	10.2
المبيعات (بليون$ أو يورو)	13.7	9.9	28.5	26.6
للشركات العامة	7.5	5.2	18.3	16.5
الخسارة الصافية (بليون$ أو يورو)	1.5	1.5	6.9	6.2
للشركات العامة	0.6	0.4	4.8	4.1





التمويل (مليون $ أمريكي أو يورو)

	أوروبا 2001	أوروبا 2000	أمريكا 2001	أمريكا 2000
IPO	175	3138	208	4997
رأسمال إضافي أصلي	723	2603	5330	24951
رأسمال مغامر	1374	1228	2392	2778
المجموع	2272	6969	7930	32726

ثبت المصطلحات
عربي ــ إنجليزي

1 ـ أوكتانول	1- octanol
1 ـ بوتانول	1-butanol
acetyl CoA/ أسيتيل كو**A**	acetyl CoA
AMP منزوع الاكسجين	deoxy **AMP**
Ang-kak/ أنج كاك	ang-kak
الـ **DNA** المتمم	CDNA
DNA تابع	satellite DNA
الـ **NADH**	NADH
الـ RNA الرسول	mRNA
الـ RNA المتدخل	interfering RNA
الـ **trilauryl amine**	trilauryl amine
إباضة فائقة	superovulation
الأبواغ	spores
أبواغ زقية	ascospores
الأتون، الفرن	kiln
الأجسام المضادة عديدة النسيلة	polyclonal antibodies
أجسام ضَمينة أو ضمنية	inclusion bodies
أجسام مضادة نباتية	plantibodies
أجسام مضادة وحيدة النسيلة	monoclonal antibodies

plantibodies	أجسام نباتية
microspotters	أجهزة وضع البقع الدقيقة
ajinomoto	أجينوموتو
mono, dicarboxilic acids	أحاديات أو ثنائيات أحماض الكربوكسليك
amino acids	الأحماض الأمينية
essential amino acids	الأحماض الأمينية الأساسية
proteogenic amino acids	الأحماض الأمينية المولدة للبروتينات
non-proteinogenic amino acids	الأحماض الأمينية غير المولدة للبروتينات
humic acids	أحماض الهيوميك
hexurenic acids	أحماض اليوريا السداسية
high fatty acids	أحماض دهنية عليا
low fatty acids	أحماض دهنية منخفضة
fluorescence quenching	إخماد الفلورة
Food and Drug Administration (FDA)	إدارة الغذاء والدواء
adriamycin	الأدريامايسين
dermis	الأدَمَة
epidermis	البَشرَة
AMP	أدينوزين أحادي الفوسفات
CAMP	أدينوزين حلقي أحادي الفوسفات
arabinose	الأرابينوز
arabinogalactans	الأرابينوغالاكتان
microbial leaching	الارتشاح الميكروبي
allergies	أرجيات، حساسيات
arginine	أرجينين
ergosterol	إرغوستيرول
erythropoietin	الإريثروبويتين
detoxification	إزالة السمّيّة

decontamination	إزالة تلوث
transplantation	الازدراع
dimorphism	ازدواج الشكل
methylene blue	أزرق الميثيلين ـ صبغة
aspartame	أسبارتام
aspartase	الأسبرتاز
elastase	الإلستاز
pharmacogenomics	استخدام الجينوم في الصناعات الصيدلانية
elution	استخراج/ شطف
extraction	استخلاص
ester	الإستر
esterification	الأسترة
recovery	الاسترجاع
estrogen	الإستروجين
acetylation	الأستلة
acetaldehyde	الأستلدهايد
gene silencing	إسكات الجينات
roquefort	اسم تجاري لاحد أنواع الجُبن
acetate	الأسيتات
acetone	أسيتون
acetoin	أسيتوين
acyclovir	الأسيكلوفر
polyA signal	إشارة متعدد الأدينين
dermatomycosis	الإصابات الجلدية الفطرية
shigellosis	الإصابة بالشيغللا
DNA repair	إصلاح الـ DNA
additives	إضافات

sulfonation	إضافة الكبريت
hydroxylation	إضافة الهيدروكسيل
adenylation	إضافة مجموعة الأدينيل
amidation	إضافة مجموعة الأميد
carboxylation	إضافة مجموعة الكربوكسيل
methylation	إضافة مجموعة ميثيل
open reading frame (ORF)	إطار القراءة المفتوح
microtiter plates	أطباق معايرة دقيقة
rerecemization	إعادة راسيمية
clone contig mapping	إعداد خرائط متجاورة النسيلة
variable numbers of tendem repeats (VNTR)	أعداد مختلفة من الإعادات العشوائية
molds	الأعفان
agar	الأغار
films	أغشية
biofilms	الأغشية الحيوية
plasmic membranes	الأغشية السيتوبلازمية
avoparcin	الأفوبارسين
insertion	إقحام
acarbose	الأكاربوز
actinomycin	الأكتينومايسين
micropropagation	الإكثار الميكروي
acrolein	الأكرولين
expandase	الإكسبنداز
catalytic oxidation	الأكسدة التحفيزية
geochemical oxidation	الأكسدة الكيميائية الأرضية ـ الجيوكيميائية
subterminal oxidation	أكسدة طرفية فرعية
subterminal oxidation	الأكسدة قبل النهائية

الإكسون	exon
الإلاستينال	elastinal
الأنزيم الأدينوزين دي أميناز	adenosine deaminase (ADA)
الالتحام، الانصهار، التلدين	annealing
التفاف ثني، طي	folding
الالتهاب الدماغي الفيروسي	viral encephalitis
ألدولاز	aldolase
الألديهايد	aldehyde
ألفا ـ أسيتولاكتات دي كاربوكسيلاز	α-acetolactate decarboxylase
ألفة	affinity
الألكان	alkanes
الإلكترونات	electrons
ألكَلة	alkylation
الألكلويدات	alkaloids
الألكين	alkenes
ألوستيرية	allosteric
أليحمو، مجموعة هيم	heme
الأليلات	alleles
الأمبيسيلين	ampicillin
الأمفوترسين	amphotericin
الأمهات المرضعات	fostering mothers
الأمواج فوق الصوتية	ultrasonication
الأموكسيسيلين	amoxicillin
الأميداز	amidases
الأميكاسين	amikacin
الأميلاز	amylase
الأميلوغلوكوزيداز	amyloglucosidases

trinitrotoluene (TNT)	الأمين ثلاثي اللوريل
aminilycosides	الأمينات السكرية
aminoacyl	الأمينوأسيل
aminoacylases	الأمينوأسيلاز
aminocyclitol	أمينوسايكليتول
catheter	أنبوب أجوف ـ القسطرة
β - interferon	الإنترفيرون ـ بيتا
interleukins	إنترلوكينات
introns	إنترونات
emphysema	انتفاخ رئوي
selection	الانتقاء
regioselectivity	انتقائية الموقع
stereoselective	انتقائية من حيث الفراغية
regioselectivity	انتقائية من حيث الموقع
signal transduction	انتقال الإشارات
antimony	الأنتيموني، عنصر فلّزي
anthracyclines	الأنثراسيكلين
anthocyanin	الأنثوسيانين
cellular fusion	الاندماج (الانصهار) الخلوي
plasmogamy	الاندماج البلازمي
karyogamy	الإندماج النووي
combinatorial	اندماجي
DNAase	أنزيم الـ DNAase
acetyltransferase	أنزيم الأسيتيل ترانسفيراز
protease	أنزيم البروتياز
flavoenzyme	الأنزيم الفلافوني
hydrogenase	أنزيم الهيدروجيناز

urease	أنزيم اليورياز
DNA dependent RNA-polymerase	أنزيم بوليميراز الـ **RNA** المعتمد على الـ DNA
fatty acid synthase	أنزيم تنشؤ ـ سينثاز ـ الأحماض الدهنية
species-specific lactate racemase	أنزيم راسيماز اللاكتات الخاص بالنوع
DNA ligase	أنزيم ربط (ليغاز) الـ **DNA**
isomerase	أنزيم مصاوغة (أيزوميراز)
carrier-bound enzymes	أنزيمات الارتباط بالحامل
esterases	أنزيمات الاستيراز
endonucleases	أنزيمات الاقتطاع النووي الداخلية (الاندونيوكلياز)
oxidoreductases	أنزيمات الأكسدة والاختزال
xidoreductase	أنزيمات الأكسدة والاختزال
pactinases	أنزيمات البكتينياز
exopectate lyase	أنزيمات البولي غالاكتويوروناز الخارجية
endopolyglacturinases	أنزيمات البولي غالاكتويوروناز الداخلية
restriction enzymes	أنزيمات الحصر
hydrolases	أنزيمات الهيدرولاز
phosphatases	أنزيمات تفكيك الفوسفات
nucleotidases	أنزيمات تفكيك النيوكليوتيدات
membrane bound enzymes	أنزيمات مرتبطة بالغشاء
ansamycine	الأنسامايسين
insulin aspart	إنسولين أسبارت
single-peak insuline	الإنسولين النقي
insulin glulisin	إنسولين غلوليزين
invertase	الإنفرتاز
mitosis	الانقسام الفتيلي أو الخيطي
meiosis	الانقسام المنصّف أو الاختزالي

IMP	إنوزين أحادي الفوسفات
pernicious animia	الأنيميا المميتة
lac operon	أوبرون اللاكتوز
oxaloacetic acid	الأوكسالواستيك
oxoglutarate	أوكسوغلوتارات
oxytetracycline	الأوكسيتتراسايكلين
dioxygenases	أكسيجيناز ثنائي
Pitchblende	أوكسيد اليورانيوم، معدن أسود لامع
terminal oxidase	الأوكسيداز الطرفي
oxynitrases	الأوكسينيتراز
protozoa	الأوليات
ethanol	الإيثانول
bioethanol	الإيثانول الحيوي
ethyl	الإيثيل
ethylene	الإيثيلين
isoleucie	أيزو ليوسين
isoglucose	الأيزوغلوكوز
inolin	الإينولين
inolinase	الإينوليناز
ion	أيون
papaya	البابايا
papain	البابابين
zona pellucida	الباحة الصافِية
primer	بادئ
preproinsuline	بادئات إنسولين أولية
degenerate primers	بادئات منحلة
starter	بادئة

mini-proinsulin	بادئة إنسولين مصغرة
maxi-prep	بالتحضير الأقصى
rational protein design	بالتصميم البروتيني المنطقي
paramagnetic resonance	بالرنين الممغنط
cycloserine	بالسايكلوسيرين، السيرين الحلقي
pyrimidine	البايريميدين
peptone	الببتون
UDP muramyl pentapeptide	ببتيد الموراميل الخماسي
acylated heptapeptide	ببتيد سباعي مؤسل
polyhydroxylated peptide	ببتيد متعدد الهيدروكسيل
linear peptides	الببتيدات الخطية
chelated peptides	الببتيدات المستخلبة
recognition sequence	بتسلسلات التمييز
single-bolus	بجرعة واحدة
major histocomptability complex (MHC)	بجزيئات معقد التوافق النسيجي الأساسية
brandy	البراندي
borscht	البرش: حساء روسي
lacquer	البرنيق
propionate	البروبيونات
protoplast	بروتوبلاست
protons	البروتونات
membrane-bound proteases	البروتياز المرتبطة بالغشاء
adhesion protein	بروتين الالتحام (الالتصاق)
single cell protein (SCP)	بروتين الخلايا المنفردة
GFP	البروتين المفلوَر الأخضر
preprotein	بروتين أولي
antifreeze protein	بروتين مانع التجمد

بروتينات الصدمة الحرارية	heat shock proteins
بروتينات تيت	tet-proteins
البروتيوم	proteome
البروثرومبين	prothrombin
البروجيستيرون	progesterone
البروجيستينات	progestins
البرولين	proline
البريغنينولون	pregnenolone
بسترة	pasteurization
البسيتراسين	bacitracin
بشكل بادئات ألبومين أولي	preproalbumen
بشكل غير عكوس	irreversibly
البكتريا الميثايلية التغذية	methylotrophic
بكتيريا الأركيا ـ العتائق	archaebacteria
البكتيريا اللاهوائية اختيارياً	facultative anaerobic bacteria
البكتيريا المؤكسِدة	oxidative bacteria
البكتيريا الملحاء	halobacteria
البكتيريا المولدة للأسيتات	acetogenic
بكتيريا الميثان	methanobacteria
بكتيريا النترتة	nitrifying bacteria
بكتيريا حمض الخل	acetic acid bactria
بكتيريا حمض اللبن	lactic acid bacteria
البكتين	pectins
البلازميد	plasmid
بلازميدات الخميرة الإيبيزومية	yeast episomal plasmid (YEP)
بلازميدات الخميرة المندمجة	yeast integrating plasmid (YIP)
البلاستيسيدين	blasticidin

endocytosis	بلعمة، التقام
polymerization	بلمرة
crystallization	البلورة
bleomycin	بليومايسين
pentosan	البنتوزان
penicillin	البنسلين
tertiary structures	البنيات الثلاثية
lead structure	البنية الأساسية (الفيصلية)
butyl cellulose	بوتيل السليلوز
β-subunit	بوحدة بيتا الفرعية
pullulan	البولان
pullulanases	البولولاناز
polyester	البولي إستر
polyacrylamide	البولي أكريلامايد
polyether	بولي إيثر
PEG	الـ بولي إيثلين غلايكول
polyketide	البولي كيتايد
polylacton	بولي لاكتون
polymycines	البولي مايسين
polyhedrin	البولي هيدرين
DNA polymerase	بوليمراز الـ **DNA**
prepolymers	البوليميرات الأولية
egg/oocyte	بويضة
desipeptides	بيبتيدات ديبسيبي
peptidyl transferase	البيبتيديل ترانسفيراز
pepstatin	البيبستاتين
β-galactosidase	بيتا ـ غالاكتوزيداز

بيتا ـ غلوكاناز	β-glucanase
بيرسلفات	persulfate
بيروسلفيت البوتاسيوم	potassium pyrosulfite
بيروفات	pyruvate
البيروكسيداز	peroxidases
البيروكسيداز المستحصل عليه من نبات الجرجار/ بيروكسيداز الجرجار	horseradish peroxidase
البيروكسيزوم	peroxisomes
البيكتات	pectate
بيماريسين	pimaricin
بينام	penams
البينزوفينون	benzophenone
بيوتيرات	butyrate
البيوتين	biotin
البيورين	purine
بيولوجيا (علم أحياء) النظم	systems biology
البيولوجيا البنيوية	Structural biology
بيولوجية البرج	tower biology
التأبير الذاتي أو التلقيح الذاتي	self-pollination
التأثير الحقلي للترانزيستورات	field-effect transistors
التاك بوليمراز	Taq polymerase
التآكل الحيوي	biocorrosion
تاكمان	Taq Man
تايروزين	tyrosine
التايروزيناز	tyrosinase
التايلوسين	tylosine
تبادلياً	reciprocally

pervaporation	تبخر خارج الغشاء
budding	التبرعم
clone fingerprinting	تبصيم النسيلة
resolution	التبيان
tetracycline	تتراسيكلين
biodegradable	تتفكك حيوياً
feedback inhibition	التثبيط الرجعي
spray drying	التجفيف بالرذاذ
biometric analysis	تحاليل القياس الحيوية
subcutaneous	تحت الجلد
mini-prep	التحضير الأدنى
hydrolysis	التحلل
glycolysis	تحلل الغلوكوز
osmolysis	تحللاً تناضحياً
tetrads	تحليل الرباعيات
flow injection analysis (FIA)	التحليل بالحقن الجرياني
tolerability	التحمل
acidification	تحميض
shift	تحوُّل (إزاحة)
biotransformation	التحويل الحيوي
transformation	تحويل، نقل
electroporation	التخريم الكهربائي
chill proofing	التخزين في على درجة حرارة منخفضة
l	التخمر اللبني
malo-lactic fermentation	تخمر المالو ـ لاكتيك
batch fermentation	تخمر بالدفعة
fermentationactofermentation	التخمير

تدبيل : تحويل المواد العضوية إلى دُبال	humification
التدفق الأيضي	metabolic flux
التربة المعالجة مكونة بشكل رئيسي من طين وطفالية	loam
تربية وتأصيل	breeding
الترجمة المُشقَّقَة	nick- translation
الترسيب بالبرودة	cryoprecipitation
ترشيح	filtration
الترشيح الفائق	ultrafiltration
تريبتوفان	tryptophan
تريبسين	trypsin
التريتيوم	H^3
التريهالوز	trehalose
التريهالوز رباعي الإستر	trehalose tetraesters
تسحيح	titration
التسريب	infusion
تسلسل تراجعي	retrogradation
تسلسلات متناظرة	palindrome sequence
التسلسلات الإجماعية	consensus sequences
التسلسلات القائدة	leader sequence
تسمم في الدم	hematotoxic
تشخيصات ما بعد الغرس	preimplantation diagnostics (PID)
تشكل الأجنة من الخلايا الجسمية	somatic embryogenesis
التصالب الرجعي	back-crossing
التصالب في الانقسام المنصّف	meiotic crossing over
التصلب اللويحي المتعدد	multiple sclerosis
التصميم بمساعدة الحاسب	CAD

biosynthesis	التصنيع الحيوي
combinatorial biosynthesis	تصنيع حيوي اندماجي
autoradiography	التصوير الشعاعي الذاتي
infrared spectroscopy	التصوير الطيفي بالأشعة تحت الحمراء
photolithographic	التصوير الليثوغرافي
expansion	تضخم
clones expansion	تضخم كلونات
amplification	تضخيم
autografting	التطعيم الذاتي
allografting	التطعيم المثلي
mutagenesis	التطفير
site-direct mutagenesis	التطفير الموجه في الموقع
Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEE	التطور المنظومي للربائط بواسطة الإغناء المطرد
directed evolution	التطور الموجه
heterosis	تعاظم القدرة
expression	التعبير
heterologous expression	التعبير المختلف الأصل
transfection	تعداء
single nucleotide polymorphism (SNP)	تعدد الأشكال بنيوكليوتيد مفرد
post-translation modifications	تعديلات ما بعد الترجمة
inactivate	تعطيل
complexing	تعقيد
follicle punctuation	تعليم الجريبات
heterokaryosis	تغاير النوى
auxotrophic	تغذية مخلطة عونية
PCR	تفاعل البوليمراز التسلسلي

multiplex PCR	تفاعل البوليمراز التسلسلي المضاعف
anaplerotic reaction	التفاعل التصليحي
addition reactions	تفاعلات الإضافة
redox reactions	تفاعلات الخزلدة
depolymerization	تفكيك البلمرة
biotechnology	التقانة الحيوية
information technolog	تقانة المعلومات
nanotechnology	التقانة النانوية
azeotropic destillation	التقطير الصامد للغليان
symbiosis	التكافل
manipulation	التلاعب
scurvy	تلف للجلد والأوعية الدموية (الأسقربوط)
inoculation	التلقيح
vaccination	التلقيح
artificial insemination (AI)	التلقيح الاصطناعي
backcrossing	التلقيح الرجعي
oral vaccination	التلقيح الفموي
cystic fibrosis (CF)	التليف المثاني
cell differentiation	تمايز الخلايا
photosynthesis	التمثيل الضوئي
mineralization	تمعدن
passive immunization	التمنيع السلبي
active immunization	التمنيع الفعال
reverse osmosis	التناضح العكسي
malting	التنبيت
epimerization	التنتؤ الفوقي
tungsten	التنجستين

purification	تنقية
ulcerative colitis	التهاب القولون التقرحي
nephritic syndrome	التهاب الكلى
rheumatoid arthritis	التهاب المفاصل الريثاني
fluorescence in-situ hybridization (FISH)	التهجين في الموقع المُفَلْوَر
hybridization	تهجين / إلتحام
microsatellite	توابع الـ DNA الدقيقة
inheretence	التوريث
toluene	التولوين
acetogenesis	توليد حمض الخل
morula	التويتة
terpene	التيربين
typhus	التيفوس
thymus	التيموس ـ الغدة الصعترية
thallus	الثالوس
thiazine	الثايزين
thymidine	الثايميدين
threonine	ثريونين
porines	ثُقيبات معدلة
phosphodiester	ثنائي استر الفوسفور
homodimer	ثنائي الأجزاء المتجانسة
diacetyl	ثنائي الأسيتيل
bivalen	ثنائية التكافؤ
diploid	ثنائية الصيغة الصبغية، مزدوجة الكلروموسوم
monocot or dicot	ثنائية أو أحادية الفلقة
thermolysin	الثيرمولايزين
single DNA strands	جديلات الـ DNA المنفردة

leprosy	الجذام (البرص)
oxygen radicals	جذور الأكسيجين الحرة
prosthetics	الجراحات الترقيعية
shear	الجز، القص
ppm	جزء بالمليون
callus	الجُسأة ـ الكالوس
disulfide bridge	جسر ثنائيي الكبريتيت
polar body	الجسم القطبي
intrmolecular hydrogen bridges	جسور الهيدروجين بين الجزيئات
cystine bridges	جسور سيستين
blastomers	الجسيمات الأرومية
stout	الجعة القوية الداكنة
aniline leather	جلد أنيليني
lithotrophic	جمادية التغذية
biocenosis	جماعة حيوية
micro total analysis system (mmm)-TAS	جهاز التحليل الكلي الدقيق
circulatory system	جهاز الدوران
spotter	جهاز وضع البقع
gyrase	الجيراز
gellan	جيلان
reporter gene	الجين المُخبِر
oncogene	الجين الورمي
recessive gene	جين متنحي
tumour suppressor genes	جينات كابحة للورم
gentamicin	الجينتومايسين
blood brain barrier (BBB)	الحاجز الدماغي الدموي
in-silico	حاسوبياً

حامل أيوني	ionophore
حامل لوني	chromophore
حبيبات	granules
حبيبات، خرزات	beads
حجيرة ـ حيز عمل	hood
حركيات من الدرجة الأولى	first order kinetics
الحصبة	measles
الحقل المتخامد أسياً	anescent field
الحقن الدهني	lipofection
الحقن المجهري	microinjection
حقيقيات النوى	eukaryotes
حلالة، رذاذ	aerosol
الحلزونيات أو الملتويات (شكل من أشكال البكتريا)	spirochaeta
حلقات لاكتام ضخمة أو ماكروية	macrolactam rings
حلقات لاكتون ضخمة	macrocyclic lactone rings
حلقة اللاكتون الضخمة	macrocyclic lacton ring
حمض S ـ هيدروكسي بنزويك ـ أمين (AHBA)	-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA),
حمض الأديبيك	adipic acid
حمض الأسبارتيك	aspartic acid
حمض الأكريليك	acrylic acid
حمض الأوليك	oleic acid
حمض البريفينيك	prephenic acid
حمض البيملك ثنائي الأمين (DAP)	diaminopimelic acid (DAP)
حمض البيوتاريك	buteric acid
حمض الخل الجليدي	glacial acetic acid
حمض الشيكميك	shikimic acid

حمض الغلوتاميك	glutamic acid
حمض الغلوكونيك	gluconic acid
حمض الغلوكونيك	gluconic acid
حمض الفيوماريك	fumaric acid
حمض الكبريت	sulfuric acid
حمض الكوريزميك	chorismic acid
حمض اللبن	Lactic acid
حمض الليمون	citric acid
حمض الماليك	maleic acid
حمض الناليديكسيك	nalidixc acid
الحمض النووي الريبي	ribonucleic acid
حمض الهيالويورينيك	hyaluronic acid
حمض الهيدروكساميك	hydroxamic acid
حمض دهني طويل السلسلة متعدد الهيدروكسيل	long-chain polyhydroxy fatty acid
حمض فينيل الخل	phenylacetic acid
حمض لبن ميثيل الإستر	lactic acid methyl ester
حمض6 ـ أمينوبينيسيلانيك	6-APA
حواتم	epitopes
خارج الجسم	ex vivo
خارج الموقع	ex situ
خارج خلوي	extracellular
خارجي المنشأ	exogenous
الخامات المنخفضة المحتوى	low-grade ores
الخانوق	diphtheria
الخبث، الامراضية	virulence
خط البذرة	germline
الخلايا الإبنة	doughter cells

mast cells	الخلايا البدينة
macrophages	الخلايا البلعمية
T-cells	الخلايا التائية
thymocytes	الخلايا التوتية
stem cells	الخلايا الجذعية
adult stem cells	الخلايا الجذعية البالغة
embryonic stem cell (ESC)	الخلايا الجذعية الجنينية
hematopoetic stem cells	الخلايا الجذعية المشكلة للدم
omnipotent stem cells	الخلايا الجذعية الموجودة في كل مكان
natural killer cells (NK)	الخلايا القاتلة الطبيعية
competent cells	الخلايا الكفؤ أو المتنافسة
granulocytes	الخلايا المحببة
monocytes	الخلايا الوحيدة
mesenchymal	خلايا جذعية لُحمية متوسطية
epithelial cells	خلايا ظهارية
chondrocytes	خلايا غضروفية
Kuppfer cells	خلايا كوبفير
keratinocytes	خلايا كيراتية
CHO	خلايا مبيض الهامستر الصيني
multi/pluripotent	خلايا متعددة القدرات
myeloma cells	خلايا نخاع ورمية
hybridoma	خلايا ورمية هجينة
gene clusters shuffling	خلط العناقيد الجينية
protein gap	الخلل البروتيني أو الفجوة البروتينية
somatic cell	خلية جسمية
fodder yeast	خمائر الأعلاف
corn steap liquor	خمر الذرة الحاد

خميرة الخباز	baker's yeast
الخيميرية/ خليطة	chimeric
الخيوط الفطرية المتشابكة ـ الميسيليوم ـ	mycelium
داء الحمى القلاعية	foot-and-mouth disease
داء السكري	diabetes mellitus
داء كراون	crohn's disease
داخل العضل	intramuscular
داخل الغشاء البيريتوني	intraperitonial
داخل خلوي	intrcellular
الداخلي المنشأ	endogenous
دارىء	buffer
دافعات	impellers
دايمرات متجانسة	homofermentation
دايمرات متخالفة	heterodimer
دايمرات، جزيئات ثنائية	dimers
الدُخن، الجاورس، الذرة	millet
دراسات الجينوم	genomics
دراسات سريرية	clinical studies
دراسة البروتيوم	proteomics
دراسة الجينوم وظيفياً	functional genomics
دراسة الخلايا	cellomics
الدكستروز	dextrose
دمج	fusion
الدنفية	cachectic
الدهون السكرية	glycolipids
الدهون الفوسفورية	phospholipids
دوارق دحرجة	roller flasks

spinner flasks	دوارق غازلة
photocycle	الدورة الضوئية
citric acid cycle	دورة حمض الليمون
doxorubicin	الدوكسوروبيسين
daunomycin	الدونومايسين
depsipeptide	الديبسي بيبتيد
digoxigenin	ديجوكسيجينين
decarboxilase	ديكاربوكسيلاز
dextran	الديكستران
dehydrogenase	ديهادروجيناز ـ نازعة الهيدروجين ـ
autotrophic	ذاتية التغذية
glycosidic linkage	رابطة غلايكوزيدية
racemic	راسمي
racemase	راسيماز
raffinose	الرافينوز
rhamnose	الرامنوز
transactylase	رانسأسيتيلاز
hamarhead ribozomes	رايبوزومات رأس المطرقة
riboflavin	الرايبوفلافين
tetramere	رباعي الأقسام
sludge	رسابة، حمأة
pH	الرقم الهيدروجيني
rickettsia	الركتيسيا
NMR	الرنين المغناطيسي النووي
conjugated double bonds	روابط اقترانية مزدوجة
robots	الروبوتات
rhodamine	الرودامين

reteplase	الريتيبلاز
rifamycin	الريفامايسين
rifampicin	الريفامبيسين
rennet	الرينيت
pseudocrystalline	زائف البلورة
zymogen	الزايموجين
xenotransplantation	الزرع الغريب
chorionic villus	الزغابة المشيمائية
zygote	الزيجوت
antiporter	الساعي السيتوبلازمي
succinoyl COA	الساكسينويل كوA
sake	الساكي
salynomycin	السالينومايسين
siderochromes	السايدوروكروم
spironolactone	السبيرونولاكتون
Ca-citrate	سترات الكالسيوم
streptavidin	ستربتافيدين
sterols	ستيرولات
steroids	الستيرويد
wrap	السداة، دثار
periost flap	سديلة سمحاقية
whooping cough	السعال الديكي
sphalerite	السفاليريت ـ التوتياء
scaffold	سقالة
pentose	السكر الخماسي
invert sugar	السكر المنقلب
hexose	سكر سداسي/ هيكسوز

sucrose	السكروز
monosaccharides	السكريات الأحادية
amino sugars	السكريات الأمينية
c-branched sugars	سكريات متفرعة الكربون
disaccharides	السكريدات الثنائية
methylene bisacrylamide	سكريلاميد المثيلين الثنائي
scleroglucan	سكليروغلوكان
cross-resistant	سلالات مقاومة تصالبياً
respiratory chain	السلسلة التنفسية
enzyme cascade	سلسلة من الأنزيمات
coleslaw	سلطة الكرنب
sodium sulfite	سلفيت الصوديوم
endotoxins	السموم الداخلية
hepatotoxic	سمية كبدية
nephrotoxic	سمية كلوية
sorbitol	سوربيتول
flagellum	سوط
sophorose	السوفوروز
somatotropin	السوماتوتروبين
cytosine	السياتوزين
cytoplasm	السيتوبلازم
cytoplast	سيتوبلاست
cytokines	السيتوكينات
serine	السيرين
cystiene	سيستيين
sisomicin	السيسوميسين
cephalosporins	سيفالوسبورين

cephems	سيفيم
silage	سيلاج (علف متخمر للماشية)
plasmid profile	سيماء البلازميد
synthons	سينثونات
endoplasmic reticulum	الشبكة الإندوبلازمية
semisynthetic	شبه مصنع
triglycerides	شحوم ثلاثية/ ثلاثي الغليسيريد
fragments	شُدف، شظايا
Klenow fragment	شدفة كلينو/ Klenow
genetic aberration	شذوذ وراثي
analytical test strips	شرائط اختبار التحليل
cider	شراب التفاح
HFS	شراب عالي المحتوى من الفركتوز
polio	شلل الأطفال
codons	شيفرات
shikonin	الشيكونين
chinolone	الشينولون / الـ chinolone
chloroplast	الصانعة اليخضورية
chromosome	صبغي، كروموسوم
yeast artificial chromosome (YAC)	كروموسومات الخميرة الصناعية
shock	الصدمة
septic shock	الصدمة الإنتانية
platelets	صفيحات الدم
DNA arrays	صفيفات الـ DNA مصفوفات الـ DNA
cultivar	الصنف
quality control	ضبط النوعية
phototroph	ضوئية التغذية

controls	الضوابط (شاهد)
block mutants	طافرات موقفة (معطِّلة)
supernatant	طافي
bioenergy	طاقة حيوية
lamella	الطبقة الرقيقة، الصفيحة
papillary	طبقة حُليمية
reticular layer	طبقة شبكية
rye meal	طحين الزؤان أو الجاودار
kinetic methods	الطرائق الحركية
streak plate method	طريقة الأطباق المخطوطة
sauekraut	طعام مُعد من ملفوف مخمرً
mutation	طفرة
parasite	طفيلي
COD	الطلب على الأكسيجين الكيميائي
BOD_5	الطلب على الأكسيجين الكيميائي الحيوي بعد خمسة أيامى حَضِن
metaphase	الطور التالي
exponential	الطور التصاعدي/ طو النمو المطرد، الاسي
lag phase	الطورَ المتأخرَ ـ طور الراحة
log phase	طورُ النمو المطرد ـ اللوغاريتمي
exponential phase	طور النمو المطرد ـ الأسي
transition phase	طور انتقالي
udder epithelium	ظهارة ضرع
phages	العاثيات
Factor VIII	العامل VIII / العامل الثامن
colony-stimulating factor (CSF)	العامل المحفز لتشكل المستعمرة
insulin-like growth hormone (IGF-1)	عامل النمو 1 الشبيه بالإنسولين

epithelial growth factor	عامل النمو الظهاري
decay accelerating factor (DAF)	عامل تسريع الإضمحلال
cytokine tumor necrosis factor (TNF)	عامل تنكرز (نخر) الورم
gelling agent	عامل تهلُّم
eutrophication	عامل منضب للأكسيجين في الماء، تأجين، خث
transcutaneouse	عبر الجلد
sourdough	العجين المتخمر
yeast dough	عجينة الخمير
pulp	عجينة الورق
illation counter	عدّاد الومضات
neutrophilic granulocytes	العدلات المحبَّبَة
multimers	عديد الأجزاء
polysaccharides	عديدات الساكاريد
plyoses	عديدات السكر
polyoses	عديدات السكر
lipopolysaccharides	عديدات السكر الدهنية
polyaromatic	عديدة الحلقات العطرية
polygenic	عديدة المورث
cytosol	العصارة الخلوية
agave	عصير الصبار الأمريكي
tekuila	عصير الصبار الأمريكي (تيكيلا)
volume-space yield	العطاء من المنتج بالنسبة إلى الحجم والفراغ
space-time yields	العطاءات الزمكانية
aromatic	عطري
cytoplasmic male sterility (CMS)	عقم ذكري سيتوبلازمي
gene therapy	العلاج الجيني
quantitative structure-activity relationships	العلاقات الكمية بين البنية والفعالية

(QSAR)

leeches	العلّيق
molecular biology	علم الأحياء الجزيئية
cellular biology	علم الأحياء الخلوي
microbiology	علم الأحياء المجهرية
pharmacology	علم الأدوية
taxonomy	علم التصنيف
physiology	علم الوظائف
half-life	عمر النصف
pyrometallurgic	عمليات التعدين الحراري
differential splicing	عمليات القطع والوصل التفاضلية
saccharification	عمليات تحويل النشاء إلى سكر
melle-Biont	عملية Melle-Biont
membrane process	عملية الغشاء
splicing	عملية القطع والوصل
aerobic sold stage fermentation	عملية تخمير هوائية ذات مرحلة صلبة
oxidative decarboxylation	عملية نزع كربون تأكسدية
hollow-fiber column reactor	العمود الليفي المجوف
parenterally	عن طريق غير الفم
long interspersed nuclear elements (LINE)	العناصر النووية المنتشرة الطويلة
short interspersed nuclear elements (SINE)	العناصر النووية قصيرة الانتشار
trace elements	عناصر ضئيلة المقدار (أثرية)
cluster	عنقود (تجمع)
reducing agents	عوامل إختزالية
thrombolytic agents	العوامل الحالة للخثرة
co-factors	عوامل مساعدة
bovin serum factors (BSF)	عوامل مصل البقر

transposons	عوامل وراثية قافزة
severe combined immunodeficiency (SCID)	العَوَز المناعي المشْتَرَكٌ الوَخيم
gari	غار
biogas	الغاز الحيوي
biowashers	الغاسلات الحيوية
Bioscrubbers	غاسلات الغاز الحيوية
galactomannanases	الغالاكتوماناناز
conidia	الغبيرة ـ الكونيديا
parathyroid hormone	هرمون الغدة الدرقية الشبيهة
gramicidin	الغراميسيدين
screening	الغربلة
systematic screening	الغربلة المنهجية
griseofulvin	الغريسيوفلفين
hyphae	غُصينات
cartilages	الغضاريف
biosphere	الغلاف الحيوي
glycine	الغلايسين
glycogen	الغلايكوجين
amino glycosides	الغلايكوزيدات الأمينية
immunoglobulins	الغلوبولينات المناعية
gluten hydrolysates	الغلوتين
glucanase	الغلوكاناز
D-glucose	الغلوكوز ـ D
Na2 + -gluconates	غلوكونات الصوديوم
Na-, Ca-gluconate	غلوكونات الصوديوم أو الكالسيوم
glycerol	الغليسرول
trilauoyl glycerol	الغليسيرول ثلاثي اللورويل

guanosine	الغوانوزين
GMP	غوانوزين أحادي الفوسفات
gonadotropin	الغونادوتروبين
blunt	غير ناتئة، عمياء
heterotrophic	غيرية التغذية
oncomouse	فأر الأورام
separator	فارز/ فاصل
murine	فأري
valinomycin	الفالينومايسين
vancomycin	الفانكومايسين
fibroin	الفبروين
fibroins	الفبروينات
activated charcoal	الفحم النباتي المفعل
periplasmic space	الفراغ المحيط بالغشاء البلازمي
phosphorylation	الفسفرة
intestinal flora	الفلورا المعوية
microbial flora	الفلورا الميكروبية
fluorosceine	الفلورسين
fluorophore	الفلوروفور، الأجسام المفلّورة
trialkylphosphate	فوسفات ثلاثي ألالكيل
bamate pesticides	فوسفات عضوي
organophosphate	فوسفات عضوي
alkaline phosphatase	الفوسفاتاز القلوي
phosphothionates	الفوسفاثيونات
phosphoamidite	الفوسفوأميديت
phosphoenol pyrovate	الفوسفوإينول بيروفات
stainless steel	فولاذ غير قابل للصدأ

in vitro	في الزجاج
in situ	في المكان
fiberinogen	الفيبرينوجين
virginiamycin	الفيرجينامايسين
monkey myoblastoma virus (MMV)	فيروس الأرومة العضلية الورمي القردي
papilloma virus	فيروس البابيلوما
baculovirus	الفيروس العصوي
adenovirus	الفيروس الغدي ـ الأدينو فيروس
Herpes virus	فيروس القوباء هربس
rabies virus	فيروس داء الكلَب
moloney mouse leukemia virus (MMLV)	فيروس لوكيميا الفأر المولوني
caulimo viruses	فيروسات التوائم
retroviruses	الفيروسات القهقرية
Gemini viruses	فيروسات كوليمو أو جيمني
femtomolar	الفيمتومولار
phenantrene	الفينانترين
phenoxazinone	فينوكسازينون
phenol oxidase	الفينول أوكسداز
phenylalanine	فينيل ألانين
electron acceptor	قابل للإلكترون
bactericidal	القاتل للبكتيريا
pitch	القار
Schiff base	قاعدة شيف
template	قالب
purity law	قانون النقاوة
cellar	قبو التخمير (مرحلة التعتيق)
corneum	قرنية الجلد

cottage cheese	القريشة
electrode	قطب كهربائي
amperometric electrode	قطب كهربائي لقياس الأمبير
nucleocapsid	القفيصة النووية
alkine	قلوي
oligomers	قليلات الوحدات
ion channels	القنوات الأيونية
photometric	القياس الضوئي
fluorometric	القياس الفَلْوَري
luminomeric	القياس اللمعاني
standard	قياسي، معياري
GRAS	الكائنات الآمنة بشكل عام
chemolithotroph	الكائنات الحية الكيميائية التغذية إجبارياً
genetically modified organisms (GMO)	الكائنات الحية المعدلة وراثياً
pathogenic microorganisms	الكائنات المجهرية الممرضة
unicellular organisms	الكائنات وحيدة الخلية
immunosuppressant	الكابح المناعي
catalase	الكاتالاز
carrageenan	كاراجينان
hydrophobic	كاره للماء
casein	الكازئين
kasugamycin	الكاسوغامايسين
cassettes	كاسيتات
calciferol	الكالسيفيرول
calcium magnesium acetate	كالسيوم مغنيزيوم الخل
calchocite	الكالشوسيت
cathepsins	الكايثبسين

catabolite inhibition	الكبح الهدمي
biomass	الكتلة الحيوية
carboxylase	كربوكسيلاز
adsorption chromatography	كروماتوغرافيا الإدمصاص
ion exchange chromatography	كروماتوغرافيا التبادل الأيوني
protein liquid chromatography (FPLC	الكروماتوغرافيا السائلة السريعة للبروتينات
gas chromatography	كروماتوغرافيا الغاز
gel chromatograpgy	كروماتوغرافيا الهلام
gel permeation chromatography	كروماتوغرافيا تعتمد على نفاذية الهلام
chromopeptides	كروموبيبتيد
creatine kinase	الكرياتين كيناز
XMP	كزانثوزين أحادي الفوسفات
Lime	الكلس
chloramphenicol	الكلورامفينيكول
chlorobenzofurans	الكلوروبنزوفوران
chloroquinone	الكلوروكوينون
cloning	كلونة
shotgun cloning	الكلونة بالقسرية
omnipotent	كلية القدرة
kanamycin	الكنامايسين
electrolytes	الكهارل
piezoelectric	كهروضغطي
reagents	الكواشف
cobalt	الكوبالت
koji	الكوجي
corticosteroid	الكورتيكوستيريد
cordite	الكوردايت

covellite	الكوفيليت
collagen	كولاجين
colistrin	الكوليسترين
konbu	كونبو
blastocyst	كيسة أريمية
kimchi	كيمتشي
chemostatin	الكيموستاتين
chymosine	الكيموسين
cytochemistry	كيمياء الخلية
biochemistry	كيمياء حيوية
chemotroph	كيميائية التغذية
facultative anaerobic	لا هوائية اختيارياً
nonglycosylated	لا يحوي الغلايكوزيد
cohesive site	اللاصقات المسماة بالكوز
Ca-lactate	لاكتات الكالسيوم
lactamases	لاكتاماز
lactose	اللاكتوز
lactoferin	اللاكتوفيرين
lactone	لاكتون
macrocyclic lactone	اللاكتون الحلقي الضخم
lactonase	اللاكتوناز
anaerobic	لاهوائي
strictly anaerobic	اللاهوائية الكجبرة
layases	اللاياز
lysine	لايسين
sour milk	اللبن الحامض
weft	اللُّحمة، قماش

sticky	لزج، دبق
lichens	اللشنيات، الحزاز أو بهق الحجر
hydrostatic pressure	للضغط الهايدروستاتي ـ ضغط توازن الموائع
naïve	اللمفاويات الغِرّ
lymphatic	لِمفية
luciferase	اللوسيفيراز
leukemia	اللوكيميا، ابيضاض الدم
leptospira	الليبتوسبيرا
liposme	الليبوزوم، الجسيم الدهني
lyzozyme	الليزوزايم
lignin	ليغنين
lincomycin	لينكومايسين
leucine	ليوسين
Health and Safety Executive (HSE)	مؤسسة الصحة والأمان
indicator	مؤشر
heteropolysaccharide emulsan	مادة الاستحلاب عديدة السكاريدات المتباينة
recombinant	مأشوب
pipettes	ماصّات
macrotetrolide	الماكروتيترولايد
macrolide	الماكرولايد
maltotriose	المالتوترايوز
malonyl-CoA	المالونيل ـ كوA
mycoplasma	المايكوبلازما
mycosterol	المايكوستيرول
exchangers	مبادِلات
cationic exchanger	مبادلات كايتونية ـ إيجابية الشحنة
homozygous	المتجانسة الزايجوت/ المتجانسة اللواقح

partially hydrolyzed	متحللة جزئياً
equimolar	متعادل مولياً
polymorphic	المتعدد الأشكال
polyhydroxybutyric	متعدد الهيدروكسي بيوتيريك
polylactides	متعدد حمض اللبن
heteroallelic	المتغاير الأليل
heterozygous	متغايرة اللواقح
allosteric	متفارغ
immobilized	مثبت
high pressure homogenizers	المجانسات ذات الضغط العالي
fractionated	مجزأ
lyophilized	مجفدة
vortex drier	مجفف دوَّام
multi-copy gene cassettes	مجموعات الجينات المتعددة النسخ
carboxylic groups	مجموعات الكربوكسيل
reporter groups	مجموعات مبلِّغة
reductive amination	مجموعة الأمين الاختزالية
risk group	مجموعة الخطورة
sulphydryl group	مجموعة السلفيدريل
homology modeling	محاكاة المجانَسة
hydrophilic	محب للماء
eosinophilic granulocytes	المحببات الأيوسينية أو الحَمِضية
mesophilic	المحبة لدرجات حرارة معتدلة
psycotropic	المحبة للبرودة
thermophilic	محبة للحرارة
lipophilic	محبة للدهون
extremophiles	المحبة للشروط المتطرفة

alkalophilic	المحبة للقلوية
ascogonia	المحتضِرات الزقية
cytostatics	محد النمو الخلوي
fungistatic	مُحِد لنمو الفطور
self-aspiring agitators	محركات هز ذاتية الحركة
promoter	محضض
biocatalyst	محفز حيوي
catalysts	محفزات
lysogenic	محلحلي
proteolytic	محلل للبروتين
transgenic	محور وراثياً
transducer	محول طاقة
silos	مخازن الغلّات
alveogram	مخططات الأجواف الهوائية
extensogram	مخططات التمدد
farinagraph	مخططات الدقيق
surfactants	مخفضات التوتر السطحي
biosurfactants	مخفضات التوتر السطحي الحيوية
buttermilk	المخيض
bioremediation	المداواة الحيوية/ الإصلاح الحيوي
solvent	مذيب
organic solvents	المذيبات العضوية
micelles	مُذَيّلات
trickling filters	مراشح الجريان المتقطع
biofilters	المراشح الحيوية
stereo centers	مراكز فراغية
inbred	مرباة ومؤصلة داخلياً

stationary phase	مرحلة الركود
clinical phase I	مرحلة سريرية I
preclinical phase	مرحلة ما قبل سريرية
tuberculosis	مرض السل
autoimmune desease	مرض مناعة ذاتية
monogenetic disease	مرض ناجم عن مورث واحد
Hansen disease	مرض هنسن
broth	مرق
analyte	المركب المُحلّل
substrate	مركب أولي
aliphatic	المركبات المفتوحة
precursors	مركبات سالفة
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية
perfusion cultures	مزارع التروية
slant culture	المزارع المائلة
explantate	المزدرع
supermolecular double helix	مزدوج حلزوني فوق جزيئي
dikaryotic	مزدوجة النواة
ale	المزر، نوع من الجعة
starter culture	مزرعة بادئة
KDPG metabolic pathway	مسار ketodeoxyphosphogluconate الأيضي
pentose phosphate pathway	مسار فوسفات السكر الخماسي
anaplerotic pathways	المسارات التصليحية
adjuvant	المساعد
probe	مسبر
vasectomized	مستئصل الأسهر

مستحاثات	fossils
مستحضرات التجميل الحيوية	biocosmetics
مستحضرات دوائية حيوية	biopharmaceuticals
مستحلِب للزيت في الماء	oil-in-water emulsifier
المستشعرات الحيوية	biosensors
مستضد	antigen
مستقبلات	receptors
مستقر حرارياً	thermostable
المستقلبات	metabolies
المستقلبات الثانوية	secondary metabolites
المستقلبات في الحي ـ ميتابولوم	metabolome
مستمنعة	immunogenic
مستويات الأمان الحيوي	biosafety levels
المسلفنة	sulfonated
مشغل حيوي (أوبيرون)	operon
المصابون بالناعور	hemophiliacs
المصاوغ المكاني ـ أنزيم التوبوأيزوميراز	topoisomerases
المصاوغة	isomerization
المصفقات	decanters
مصواغ مرآتي	enantiomer
مُصَوِّر الفوسفور	phosphoimager
مضاد التريبسين ألفا 1	α1-antitrypsin
مضاد للأكسدة	antioxidant
المضاد للتعبير	antisense
مضادات البوليين الحيوية	polyene antibiotics
مضادات التخثر	anticoagulants
مضادات الحيوية	antibiotics

مضاعف الجديلة، مزدوج الشريط	double-sranded
مضاف إليها جين محدد	knock-in
مضافاً عليها مجموعة غلايكوزيل	glycosylated
مضعَّفة (مخففة)	attenuated
مطاوعة زائفة	pseudoplastic
مطياف الكتلة MALDI-TOF	MS - MALDI-TOF
معادن انتقالية	transition metals
المعايرات	assays
المعايرات المناعية	immunoassays
المعايرة المناعية الاشعاعية	radioimmunoassay (RIA)
معدل النمو النوعي	specific growth rate
معدل تحويل	turn over rate
المعطلة	neutralizing
المعفرات، الأنثريدات: عضو تذكير اللازهريات	antheridia
معلق	suspension
مغزل	spindle
مغشاة، مُعلّبة	encapsulated
مفاعل الأغشية الأنزيمية	enzyme membrane reactor
مفاعل حيوي منظم كميائياً	chemostat
المفاعلات الحيوية ذات القعر الطويل	long bed bioreacters
مفاعلات الدارة	loop reactors
مفاعلات حيوية	bioreactors
مكافئ الديكستروز	dextrose Equivalent
مكافئات العطاء	yields coefficients
مكننة الترجمة	translation machinery
الملت: شعير مثبت في الماء لصنع الكحول	malt
ملطف	softener

مناخل جزيئية	molecular sieves
مناطق تحديد المتمم	complementarity-determining region (CDRs)
منعدمة التناظر المرآتي	chiral
منفحة التجبين ـ الرينين ـ	rennins
منقوصة جين محدد	knockout
المواءمة المناعية	immunocomptability
الموائمة حيوياً	bicompatable
المواد الغروية، تغرية	sizing
المواد الغريبة (الدخيلة)	xenobiotics
مواد نخالية	furfural
المواقع ذات التسلسل المُعلَّم	ence tagged sites (STS)
موت الخلايا المنظم	apoptosis
موجبة الغرام	gram positive
مورومي، هريس	mash
مول، وزن جزيئي غرامي في ليتر من المذيب	mole
المولاس، دبس السكر	molassases
المولد للمالتوز	maltogenic
الموليبدنيوم	molybdenum
المونانسين	monensin
ميتوكوندريا ـ المتقدرة ـ	mitochondria
الميثان	methane
ميثيسيلين	methicillin
الميثيل	methyl
ميثيل كربوني	C-methyl
ميثيونين	methionine
ميركابتان	mercaptans

الميلانوم، الورم القتاميني	melanoma
الميورين	murien
ناسخ عكسي	reverse transcriptase
الناشبة	hapten
الناعور	hemophilia
ناقل عصبي	neurotransmitter
نبات الخرشوف	topinambur
النبذ المركزي التفاضلي	differential centrifugation
النبذ أو الطرد المركزي	centrifugation
النخاع العظمي	bone marrow
نخاعية	myeloic
النسيج الإنشائي، أو المرستيمي ألمولد	meristem
النسيج الضام	connective tissue
نصفِي السيلولوز	hemicellulose
النظائر المشعة	radioactive isotopes
نظام المتممات	complement system
نظام المناعة الظرفي	humoral immune system
النظم الميكروية	microsystem
نظم بالاعتماد على مستوى العكر	turbidostat
نظير	analog
نقص سكر الدم	hypoglycemia
نقطة الانصهار	melting point
نقطة توازن الشحنات	isoelectric point
نقع، تعطين الكتان	maceration
نقيع الملت	wort
نمط الدفعة المغذاة	fed-batch pattern

phenotype	النمط الظاهري
genotype	نمطاً وراثياً
vegetatively	النمو النباتي
phototrophic growth	النمو بالتغذية الضوئية
hydrolysates	نواتج التحلل
expression vectors	نواقل تعبير
shuttle vectors	نواقل مكوكية
specificity	النوعية
haploid prenuclei	نوى أولية أحادية الصيغة الصبغية
nitrate	النيترات
nitroglycerol	النيتروغليسرول
nitrite	النيتريت
nystatin	النيستاتين
nisin	نيسين
nickel	النيكل
nucleoid	النيكلويد
nucleaside	النيكليوزايد
nuclease	نيوكلياز
nucleotides	نيوكليوتيدات
nucleosides	النيوكليوزيدات
neomycins	النيومايسين
AOX	الهالوجينات العضوية القابلة للادمصاص
hydantoinase	الهايدانتيوناز
hydrocortisone	الهايدروكورتيزون
capillary electrophoresis	الهجرة الكهربائية الشعرية
electrphoresis	الهجرة الكهربائية ، الرحلان الكهربائي
Herpesuteining hormone	هربس

هرمون اللُوتِن	luteining hormone
هرمون ضوئي	photohormone
الهستونات	histones
هشاشة العظام	osteoporosis
الهضم	digestion
هلمنة	gelatinizatin
الهندسة الوراثية	genetic engineering
الهيبارين	heparin
الهيبوكلورات القلوية	alkaline hypochlorite
الهيدروكربونات المتعددة الحلقات العطرية	polyaromatic hydrocarbons (PAH)
الهيدروكربونات المكلورة	chlorinated hydrocarbons (CHC)
الهيدروكسيل	hydroxyl
الهيرودين	hirudin
الهيكساديكان	hexadecane
الهيموغلوبين، خضاب الدم	hemoglobin
الواسمات المشعة	radioactive markers
واسمات وراثية	genetic markers
والارماغناك	armagnac
والترشيح بالجريان التصالبي ـ المستعرض ـ	cross flow filtration
والتصنيع بمساعدة الحاسب	CAM
والتغليف الميكروي	microencapsulation
والتوبراميسين	tobramycin
والثريونين	threonine
والسايكلوسبورين	cyclosporine
والسبايدروينات	spirdroins
والسبيرامايسين	spiramycin

stigmasterol	والستيغماستيرول
ciprofloxacin	والسيبروفلوكساسين
selenite	والسيلينيت
phosphinothricine	والفوسفينوثريسين
ferredoxin	والفيريدوكسين
cognac	والكونياك
chygromycin	والكيغرومايسين
lipase	والليباز
metabolic engineering	والهندسة الأيضية
monooxygenases	وأنزيم الأكسجة الأحادية ـ مونوأكسيجيناز
subunits	وحدات فرعية
23S RNA subunit	وحدة الـ RNA الفرعية 23 S الرايبوزومية
colony-forming units (cfu)	وحدة تشكيل مستعمرة
reverse genetics	الوراثة العكوسة
chronic granulomatosis	الوُرام الحبيبي المزمن
lymphoblastoma	الورم الأرومي اللمفاوي
molecular weight	وزن جزيئي
intermediates	الوسائط
southern blot	وصمة ساوثيرن
northern blot	وصمة نورثرن
western blot	وصمة وسترن
short stretches	وصيلات، تمديدات قصيرة
adapters	وصيلات، مهيئات
International Code of Nomenclature of Bacteria (ICNB)	يحتوي دليل التسمية الدولي للبكتيريا
catalyse	يحفز

intercalates	يدخل ضمن
code	يشفر
episomes	يصبوغ
dideoxynucleotides	النيوكليوتيدات منقوصه الأكسجين الثنائية
uranum	اليورانيوم

ثبت المصطلحات
إنجليزي ــ عربي

1- octanol	1 ـ أوكتانول
1-butanol	1 ـ بوتانول
23S RNA subunit	وحدة الـ RNA الفرعية S23 الرايبوزومية
6-APA	حمض6 ـ أمينوبينيسيلانيك
acarbose	الأكاربوز
acetaldehyde	الأستلدهايد
acetate	الأسيتات
acetic acid bactria	بكتيريا حمض الخل
acetogenesis	توليد حمض الخل
acetogenic	البكتيريا المولدة للأسيتات
acetoin	أسيتوين
acetone	أسيتون
acetyl CoA	acetyl CoA / أسيتيل كوA
acetylation	الأستلة
acetyltransferase	أنزيم الأسيتيل ترانسفيراز
acidification	تحميض
acrolein	الأكرولين
acrylic acid	حمض الأكريليك
actinomycin	الأكتينومايسين

activated charcoal	الفحم النباتي المفعل
active immunization	التمنيع الفعال
acyclovir	الأسيكلوفر
acylated heptapeptide	ببتيد سباعي مؤسل
adapters	وصيلات، مهيئات
addition reactions	تفاعلات الإضافة
additives	إضافات
adenosine deaminase (ADA)	الأنزيم الأدينوزين دي أميناز
adenovirus	الفيروس الغدي ـ الأدينو فيروس
adenylation	إضافة مجموعة الأدينيل
adhesion protein	بروتين الالتحام (الالتصاق)
adipic acid	حمض الأديبيك
adjuvant	المساعد
adriamycin	الأدريامايسين
adsorption chromatography	كروماتوغرافيا الإدمصاص
adult stem cells	الخلايا الجذعية البالغة
aerobic sold stage fermentation	عملية تخمير هوائية ذات مرحلة صلبة
aerosol	حلالة، رذاذ
affinity	ألفة
agar	الأغار
agave	عصير الصبار الأمريكي
ajinomoto	أجينوموتو
aldehyde	الألديهايد
aldolase	ألدولاز
ale	المزر، نوع من الجعة
aliphatic	المركبات المفتوحة
alkaline hypochlorite	الهيبوكلورات القلوية

alkaline phosphatase	الفوسفاتاز القلوي
alkaloids	الألكلويدات
alkalophilic	المحبة للقلوية
alkanes	الألكان
alkenes	الألكين
alkine	قلوي
alkylation	ألكَلة
alleles	الأليلات
allergies	أرجيات، حساسيات
allografting	التطعيم المثلي
allosteric	ألوستيرية
allosteric	متفارغ
alveogram	مخططات الأجواف الهوائية
amidases	الأميداز
amidation	إضافة مجموعة الأميد
amikacin	الأميكاسين
aminilycosides	الأمينات السكرية
amino acids	الأحماض الأمينية
amino glycosides	الغلايكوزيدات الأمينية
amino sugars	السكريات الأمينية
-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA)	حمض s ـ هيدروكسي بنزويك ـ أمين (AHBA)
aminoacyl	الأمينوأسيل
aminoacylases	الأمينوأسيلاز
aminocyclitol	أمينوسايكليتول
amoxicillin	الأموكسيسيلين
AMP	أدينوزين أحادي الفوسفات
amperometric electrode	قطب كهربائي لقياس الأمبير

amphotericin	الأمفوترسين
ampicillin	الأمبيسيلين
amplification	تضخيم
amylase	الأميلاز
amyloglucosidases	الأميلوغلوكوزيداز
anaerobic	لاهوائي
analog	نظير
analyte	المركب المُحلّل
analytical test strips	شرائط اختبار التحليل
anaplerotic pathways	المسارات التصليحية
anaplerotic reaction	التفاعل التصليحي
anescent field	الحقل المتخامد أسياً
ang-kak	Ang-kak/ أنج كاك
aniline leather	جلد أنيليني
annealing	الالتحام، الانصهار، التلدين
ansamycine	الأنسامايسين
antheridia	المعفرات، الانثريدات: عضو تذكير اللازهريات
anthocyanin	الأنثوسيانين
anthracyclines	الأنثراسيكلين
antibiotics	مضادات الحيوية
anticoagulants	مضادات التخثر
antifreeze protein	بروتين مانع التجمد
antigen	مستضد
antimony	الأنتيموني، عنصر فلّزي
antioxidant	مضاد للأكسدة
antiporter	الساعي السيتوبلازمي
antisense	المضاد للتعبير

AOX	الهالوجينات العضوية القابلة للادمصاص
apoptosis	موت الخلايا المنظم
arabinogalactans	الأرابينوغالاكتان
arabinose	الأرابينوز
archaebacteria	بكتيريا الأركيا ـ العتائق
arginine	أرجينين
armagnac	والارماغناك
aromatic	عطري
artificial insemination (AI)	التلقيح الاصطناعي
ascogonia	المحتضِرات الزقية
ascospores	أبواغ زقية
aspartame	أسبارتام
aspartase	الأسبرتاز
aspartic acid	حمض الأسبارتيك
assays	المعايرات
attenuated	مضعَّفة (مخففة)
autografting	التطعيم الذاتي
autoimmune desease	مرض مناعة ذاتية
autoradiography	التصوير الشعاعي الذاتي
autotrophic	ذاتية التغذية
auxotrophic	تغذية مخلطة عونية
avoparcin	الأفوبارسين
azeotropic destillation	التقطير الصامد للغليان
bacitracin	البسيتراسين
backcrossing	التلقيح الرجعي
back-crossing	التصالب الرجعي
bactericidal	القاتل للبكتيريا

baculovirus	الفيروس العصوي
baker's yeast	خميرة الخباز
bamate pesticides	فوسفات عضوي
batch fermentation	تخمر بالدفعة
beads	حبيبات، خرزات
benzophenone	البينزوفينون
bicompatable	الموائمة حيوياً
biocatalyst	محفز حيوي
biocenosis	جماعة حيوية
biochemistry	كيمياء حيوية
biocorrosion	التآكل الحيوي
biocosmetics	مستحضرات التجميل الحيوية
biodegradable	تتفكك حيوياً
bioenergy	طاقة حيوية
bioethanol	الإيثانول الحيوي
biofilms	الأغشية الحيوية
biofilters	المراشح الحيوية
biogas	الغاز الحيوي
biomass	الكتلة الحيوية
biometric analysis	تحاليل القياس الحيوية
biopharmaceuticals	مستحضرات دوائية حيوية
bioreactors	مفاعلات حيوية
bioremediation	المداواة الحيوية/ الإصلاح الحيوي
biosafety levels	مستويات الأمان الحيوي
Bioscrubbers	غاسلات الغاز الحيوية

biosensors	المستشعرات الحيوية
biosphere	الغلاف الحيوي
biosurfactants	مخفضات التوتر السطحي الحيوية
biosynthesis	التصنيع الحيوي
biotechnology	التقانة الحيوية
biotin	البيوتين
biotransformation	التحويل الحيوي
biowashers	الغاسلات الحيوية
bivalent	ثنائية التكافؤ
blasticidin	البلاستيسيدين
blastocyst	كُيّسة أريمية
blastomers	الجسيمات الأرومية
bleomycin	بليومايسين
block mutants	طافرات موقفة (معطِّلة)
blood brain barrier (BBB)	الحاجز الدماغي الدموي
blunt	غير ناتئة، عمياء
BOD_5	الطلب على الأكسيجين الكيميائي الحيوي بعد خمسة أيام حَضِن
bone marrow	النخاع العظمي
borscht	البرش: حساء روسي
bovin serum factors (BSF)	عوامل مصل البقر
brandy	البراندي
breeding	تربية وتأصيل
broth	مرق
budding	التبرعم
buffer	داريء
buteric acid	حمض البيوتاريك

buttermilk	المخيض
butyl cellulose	بوتيل السليلوز
butyrate	بيوتيرات
cachectic	الدنفية
Ca-citrate	سترات الكالسيوم
CAD	التصميم بمساعدة الحاسب
Ca-lactate	لاكتات الكالسيوم
calchocite	الكالشوسيت
calciferol	الكالسيفيرول
calcium magnesium acetate	كالسيوم مغنيزيوم الخل
callus	الجُسأة ـ الكالوس
CAM	والتصنيع بمساعدة الحاسب
CAMP	أدينوزين حلقي أحادي الفوسفات
capillary electrophoresis	الهجرة الكهربائية الشعرية
carboxylase	كربوكسيلاز
carboxylation	إضافة مجموعة الكربوكسيل
carboxylic groups	مجموعات الكربوكسيل
carrageenan	كاراجينان
carrier-bound enzymes	أنزيمات الإرتباط بالحامل
cartilages	الغضاريف
casein	الكازئين
cassettes	كاسيتات
catabolite inhibition	الكبح الهدمي
catalase	الكاتالاز
catalyse	يحفز
catalysts	محفزات
catalytic oxidation	الأكسدة التحفيزية

cathepsins	الكايثبسين
catheter	أنبوب أجوف ـ القسطرة
cationic exchanger	مبادلات كايتونية ـ إيجابية الشحنة
caulimo viruses	فيروسات التوائم
c-branched sugars	سكريات متفرعة الكربون
CDNA	الـ **DNA** المتمم
cell differentiation	تمايز الخلايا
cellar	قبو التخمير (مرحلة التعتيق)
cellomics	دراسة الخلايا
cellular biology	علم الأحياء الخلوي
cellular fusion	الاندماج (الانصهار) الخلوي
centrifugation	النبذ أو الطرد المركزي
cephalosporins	سيفالوسبورين
cephems	سيفيم
chelated peptides	الببتيدات المستخلبة
chemolithotroph	الكائنات الحية الكيميائية التغذية إجبارياً
chemostat	مفاعل حيوي منظم كيميائياً
chemostatin	الكيموستاتين
chemotroph	كيميائية التغذية
chill proofing	التخزين في على درجة حرارة منخفضة
chimeric	الخيميرية/ خليطة
chinolone	الشينولون / الـ chinolone
chiral	منعدمة التناظر المرآتي
chloramphenicol	الكلورامفينيكول
chlorinated hydrocarbons (CHC)	الهيدروكربونات المكلورة
chlorobenzofurans	الكلوروبنزوفوران
chloroplast	الصانعة اليخضورية

chloroquinone	الكلوروكوينون
CHO	خلايا مبيض الهامستر الصيني
chondrocytes	خلايا غضروفية
chorionic villus	الزغابة المشيمائية
chorismic acid	حمض الكوريزميك
chromopeptides	كرومويبيتيد
chromophore	حامل لوني
chromosome	صبغي، كروموسوم
chronic granulomatosis	الوُرام الحبيبي المزمن
chygromycin	والكيغرومايسين
chymosine	الكيموسين
cider	شراب التفاح
ciprofloxacin	والسيبروفلوكساسين
circulatory system	جهاز الدوران
citric acid	حمض الليمون
citric acid cycle	دورة حمض الليمون
clinical phase I	مرحلة سريرية I
clinical studies	دراسات سريرية
clone contig mapping	إعداد خرائط متجاورة النسيلة
clone fingerprinting	تبصيم النسيلة
clones expansion	تضخم كلونات
cloning	كلونة
cluster	عنقود (تجمع)
C-methyl	ميثيل كربوني
cobalt	الكوبالت
COD	الطلب على الأكسيجين الكيميائي
code	يشفر

codons	شيفرات
co-factors	عوامل مساعدة
cohesive site	اللاصقات المسماة بالكوز
coleslaw	سلطة الكرنب
colistrin	الكوليسترين
collagen	كولاجين
colony-forming units (cfu)	وحدة تشكيل مستعمرة
colony-stimulating factor (CSF)	العامل المحفز لتشكل المستعمرة
combinatorial	اندماجي
combinatorial biosynthesis	تصنيع حيوي اندماجي
competent cells	الخلايا الكفؤ أو المتنافسة
complement system	نظام المتممات
complementarity-determining region (CDRs)	مناطق تحديد المتمم
complexing	تعقيد
conidia	الغبيرة ـ الكونيديا
conjugated double bonds	روابط اقترانية مزدوجة
connective tissue	النسيج الضام
consensus sequences	التسلسلات الإجماعية
controls	الضوابط (شاهد)
cordite	الكوردايت
corn steap liquor	خمر الذرة الحاد
corneum	قرنية الجلد
corticosteroid	الكورتيكوستيريد
cottage cheese	القريشة
covellite	الكوفيليت
creatine kinase	الكرياتين كيناز

crohn's disease	داء كراون
cross flow filtration	والترشيح بالجريان التصالبي ـ المستعرض ـ
cross-resistant	سلالات مقاومة تصالبياً
cryoprecipitation	الترسيب بالبرودة
crystallization	البلورة
cultivar	الصنف
cycloserine	بالسايكلوسيرين، السيرين الحلقي
cyclosporine	والسايكلوسبورين
cystic fibrosis (CF)	التليف المثاني
cystiene	سيستيين
cystine bridges	جسور سيستين
cytochemistry	كيمياء الخلية
cytokine tumor necrosis factor (TNF)	عامل تنكرز (نخر) الورم
cytokines	السيتوكينات
cytoplasm	السيتوبلازم
cytoplasmic male sterility (CMS)	عقم ذكري سيتوبلازمي
cytoplast	سيتوبلاست
cytosine	السياتوزين
cytosol	العصارة الخلوية
cytostatics	محد النمو الخلوي
daunomycin	الدونومايسين
decanters	المصفقات
decarboxilase	ديكاربوكسيلاز
decay accelerating factor (DAF)	عامل تسريع الاضمحلال
decontamination	إزالة تلوث
degenerate primers	بادئات منحلة
dehydrogenase	ديهادروجيناز ـ نازعة الهيدروجين ـ

deoxy AMP	AMP منزوع الاكسجين
depolymerization	تفكيك البلمرة
depsipeptide	الديبسي بيبتيد
dermatomycosis	الإصابات الجلدية الفطرية
dermis	الأدَمَة
desipeptides	بيبتيدات ديبسيبي
detoxification	إزالة السمية
dextran	الديكستران
dextrose	الدكستروز
dextrose Equivalent	مكافئ الديكستروز
D-glucose	الغلوكوز ـ D
diabetes mellitus	داء السكري
diacetyl	ثنائي الأسيتيل
diaminopimelic acid (DAP)	حمض البيملك ثنائي الأمين (DAP)
dideoxynucleotides	النيوكليوتيدات منقوصه الأكسجين الثنائية
differential centrifugation	النبذ المركزي التفاضلي
differential splicing	عمليات القطع والوصل التفاضلية
digestion	الهضم
digoxigenin	ديجوكسيجينين
dikaryotic	مزدوجة النواة
dimers	دايمرات، جزيئات ثنائية
dimorphism	ازدواج الشكل
dioxygenases	أكسيجين ثنائي
diphtheria	الخانوق
diploid	ثنائية الصيغة الصبغية، مزدوجة الكلروموسوم
directed evolution	التطور الموجه
disaccharides	السكريدات الثنائية

disulfide bridge	جسر ثنائي الكبريتيت
DNA arrays	صفيفات الـ DNA/ مصفوفات الـ DNA
DNA dependent RNA-polymerase	أنزيم بوليميراز الـ RNA المعتمد على الـ DNA
DNA ligase	أنزيم ربط (ليغاز) الـ DNA
DNA polymerase	بوليمراز الـ DNA
DNA repair	إصلاح الـ DNA
DNAase	أنزيم الـ DNAase
double-sranded	مضاعف الجديلة، مزدوج الشريط
doughter cells	الخلايا الإبنة
doxorubicin	الدوكسوروبيسين
egg/oocyte	بويضة
elastase	إلستاز
elastinal	الإلاستينال
electrode	قطب كهربائي
electrolytes	الكهارل
electron acceptor	قابل للإلكترون
electrons	الالكترونات
electroporation	التخريم الكهربائي
electrphoresis	الهجرة الكهربائية، الرحلان الكهربائي
elution	استخراج/ شطف
embryonic stem cell (ESC)	الخلايا الجذعية الجنينية
emphysema	انتفاخ رئوي
enantiomer	مصواغ مرآتي
encapsulated	مغشاة، مُعلّبة
ence tagged sites (STS)	المواقع ذات التسلسل المُعلَّم
endocytosis	بلعمة، التقام

endogenous	الداخلي المنشأ
endonucleases	أنــزيــمــات الاقــتــطــاع الــنــووي الــداخــلية (الإندونيوكلياز)
endoplasmic reticulum	الشبكة الإندوبلازمية
endopolyglacturinases	أنزيمات البولي غالاكتويوروناز الداخلية
endotoxins	السموم الداخلية
enzyme cascade	سلسلة من الأنزيمات
enzyme membrane reactor	مفاعل الأغشية الأنزيمية
eosinophilic granulocytes	المحببات الأيوسينية أو الحَمِضية
epidermis	البَشَرة
epimerization	التنتؤ الفوقي
episomes	يصبوغ
epithelial cells	خلايا ظهارية
epithelial growth factor	عامل النمو الظهاري
epitopes	حواتم
equimolar	متعادل مولياً
ergosterol	إرغوستيرول
erythropoietin	الإريثروبويتين
essential amino acids	الأحماض الأمينية الأساسية
ester	الإستر
esterases	أنزيمات الإستيراز
esterification	الأسترة
estrogen	الإستروجين
ethanol	الإيثانول
ethyl	الإيثيل
ethylene	الإيثيلين

eukaryotes	حقيقيات النوى
eutrophication	عامل منضب للأكسيجين في الماء، تأجين، خث
ex situ	خارج الموقع
ex vivo	خارج الجسم
exchangers	مبادِلات
exogenous	خارجي المنشأ
exon	الإكسون
exopectate lyase	أنزيمات البولي غالاكتويوروناز الخارجية
expandase	الإكسبنداز
expansion	تضخم
explantate	المزدرع
exponential	الطور التصاعدي/ طو النمو المطرد، الاسي
exponential phase	طور النمو المطرد ـ الأسي
expression	التعبير
expression vectors	نواقل تعبير
extensogram	مخططات التمدد
extracellular	خارج خلوي
extraction	استخلاص
extremophiles	المحبة للشروط المتطرفة
Factor VIII	العامل VIII / العامل الثامن
facultative anaerobic	لا هوائية اختيارياً
facultative anaerobic bacteria	البكتيريا اللاهوائية اختيارياً
farinagraph	مخططات الدقيق
fatty acid synthase	أنزيم تنشؤ ـ سينثاز ـ الأحماض الدهنية
fed-batch pattern	نمط الدفعة المغذاة
feedback inhibition	التثبيط الرجعي

femtomolar	الفيمتومولار
fermentation	التخمير
ferredoxin	والفيريدوكسين
fiberinogen	الفيبرينوجين
fibroin	الفبروين
fibroins	الفبروينات
field-effect transistors	التأثير الحقلي للترانزيستورات
films	أغشية
filtration	ترشيح
first order kinetics	حركيات من الدرجة الأولى
flagellum	سوط
flavoenzyme	الأنزيم الفلافوني
flow injection analysis (FIA)	التحليل بالحقن الجرياني
fluorescence in-situ hybridization (FISH)	التهجين في الموقع المُفَلْوَر
fluorescence quenching	إخماد الفلورة
fluorometric	القياس الفَلْوَري
fluorophore	الفلوروفور، الأجسام المفلّورة
fluorosceine	الفلورسين
fodder yeast	خمائر الأعلاف
folding	التفاف / ثني، طي
follicle punctuation	تعليم الجريبات
Food and Drug Administration (FDA)	إدارة الغذاء والدواء
foot-and-mouth disease	داء الحمى القلاعية
fossils	مستحاثات
fostering mothers	الأمهات المرضعات
fractionated	مجزأ
fragments	شُدف، شظايا

fumaric acid	حمض الفيوماريك
functional genomics	دراسة الجينوم وظيفياً
fungistatic	مُحِد لنمو الفطور
furfural	مواد نخالية
fusion	دمج
galactomannanases	الغالاكتوماناناز
gari	غار
gas chromatography	كروماتوغرافيا الغاز
gel chromatograpgy	كروماتوغرافيا الهلام
gel permeation chromatography	كروماتوغرافيا تعتمد على نفاذية الهلام
gelatinizatin	هلمنة
gellan	جيلان
gelling agent	عامل تهلُّم
Gemini viruses	فيروسات كوليمو أو جيمني
gene clusters shuffling	خلط العناقيد الجينية
gene silencing	إسكات الجينات
gene therapy	العلاج الجيني
genetic aberration	شذوذ وراثي
genetic engineering	الهندسة الوراثية
genetic markers	واسمات وراثية
genetically modified organisms (GMO)	الكائنات الحية المعدلة وراثيا
genomics	دراسات الجينوم
genotype	نمطاً وراثياً
gentamicin	الجينتومايسين
geochemical oxidation	الأكسدة الكيميائية الأرضية ـ الجيوكيميائية
germline	خط البذرة
GFP	البروتين المفلوَر الأخضر

glacial acetic acid	حمض الخل الجليدي
glucanase	الغلوكاناز
gluconic acid	حمض الغلوكونيك
gluten hydrolysates	الغلوتين
glycerol	الغليسرول
glycine	الغلايسين
glycogen	الغلايكوجين
glycolipids	الدهون السكرية
glycolysis	تحلل الغلوكوز
glycosidic linkage	رابطة غلايكوزيدية
glycosylated	مضافاً عليها مجموعة غلايكوزيل
GMP	غوانوزين أحادي الفوسفات
gonadotropin	الغونادوتروبين
gram positive	موجبة الغرام
gramicidin	الغراميسيدين
granules	حبيبات
granulocytes	الخلايا المحببة
GRAS	الكائنات «الآمنة بشكل عام»
griseofulvin	الغريسيوفلفين
guanosine	الغوانوزين
gyrase	الجيراز
H^3	التريتيوم
half-life	عمر النصف
halobacteria	البكتيريا الملحاء
hamarhead ribozomes	رايبوزومات رأس المطرقة
Hansen disease	مرض هنسن
haploid prenuclei	نوى أولية أحادية الصيغة الصبغية

hapten	الناشبة
Health and Safety Executive (HSE)	مؤسسة الصحة والأمان
heat shock proteins	بروتينات الصدمة الحرارية
hematopoetic stem cells	الخلايا الجذعية المشكلة للدم
hematotoxic	تسمّم في الدم
heme	أليحمو، مجموعة هيم
hemicellulose	نصفِي السيلولوز
hemoglobin	الهيموغلوبين، خضاب الدم
hemophilia	الناعور
hemophiliacs	المصابون بالناعور
heparin	الهيبارين
hepatotoxic	سمية كبدية
Herpes	هربس
Herpes virus	فيروس القوباء هربس
heteroallelic	المتغاير الأليل
heterodimer	دايمرات متخالفة
heterokaryosis	تغاير النوى
heterologous expression	التعبير المختلف الأصل
heteropolysaccharide emulsan	مادة الاستحلاب عديدة السكاريدات المتباينة
heterosis	تعاظم القدرة
heterotrophic	غيرية التغذية
heterozygous	متغايرة اللواقح
hexadecane	الهيكساديكان
hexose	سكر سداسي/ هيكسوز
hexurenic acids	أحماض اليوريا السداسية
HFS	شراب عالي المحتوى من الفركتوز
high fatty acids	أحماض دهنية عليا

high pressure homogenizers	المجانسات ذات الضغط العالي
hirudin	الهيرودين
histones	الهستونات
hollow-fiber column reactor	العمود الليفي المجوف
homodimer	ثنائي الأجزاء المتجانسة
homofermentation	دايمرات متجانسة
homology modeling	محاكاة المجانَسة
homozygous	المتجانسة الزايجوت/ المتجانسة اللواقح
hood	حجيرة ـ حيز عمل
horseradish peroxidase	البيروكسيداز المستحصل عليه من نبات الجرجار/ بيروكسيداز الجرجار
humic acids	أحماض الهيوميك
humification	تدبيل : تحويل المواد العضوية إلى دُبال
humoral immune system	نظام المناعة الظرفي
hyaluronic acid	حمض الهيالويورينيك
hybridization	تهجين / إلتحام
hybridoma	خلايا ورمية هجينة
hydantoinase	الهايدانتيوناز
hydrocortisone	الهايدروكورتيزون
hydrogenase	أنزيم الهيدروجيناز
hydrolases	أنزيمات الهيدرولاز
hydrolysates	نواتج التحلل
hydrolysis	التحلل
hydrophilic	محب للماء
hydrophobic	كاره للماء
hydrostatic pressure	للضغط الهايدروستاتي ـ ضغط توازن الموائع
hydroxamic acid	حمض الهيدروكساميك

hydroxyl	الهيدروكسيل
hydroxylation	إضافة الهيدروكسيل
hyphae	غُصينات
hypoglycemia	نقص سكر الدم
illation counter	عدّاد الومضات
immobilized	مثبت
immunoassays	المعايرات المناعية
immunocomptability	المواءمة المناعية
immunogenic	مستمنعة
immunoglobulins	الغلوبولينات المناعية
immunosuppressant	الكابح المناعي
IMP	إنوزين أحادي الفوسفات
impellers	دافعات
in situ	في المكان
in vitro	في الزجاج
inactivate	تعطيل
inbred	مرباة ومؤصلة داخلياً
inclusion bodies	أجسام ضَمينة أو ضمنية
indicator	مؤشر
information technolog	تقانة المعلومات
infrared spectroscopy	التصوير الطيفي بالأشعة تحت الحمراء
infusion	التسريب
inheretence	التوريث
inoculation	التلقيح
inolin	الإينولين
inolinase	الإينوليناز
insertion	إقحام

in-silico	حاسوبياً
insulin aspart	إنسولين أسبارت
insulin glulisin	إنسولين غلوليزين
insulin-like growth hormone (IGF-1)	عامل النمو 1 الشبيه بالإنسولين
intercalates	يدخل ضمن
interfering RNA	الـ RNA المتدخل
interleukins	نترلوكينات
intermediates	الوسائط
International Code of Nomenclature of Bacteria (ICNB)	يحتوي دليل التسمية الدولي للبكتيريا
intestinal flora	الفلورا المعوية
intramuscular	داخل العضل
intraperitonial	داخل الغشاء البيريتوني
intrcellular	داخل خلوي
intrmolecular hydrogen bridges	جسور الهيدروجين بين الجزيئات
introns	إنترونات
invert sugar	السكر المنقلب
invertase	الإنفرتاز
ion	أيون
ion channels	القنوات الأيونية
ion exchange chromatography	كروماتوغرافيا التبادل الأيوني
ionophore	حامل أيوني
irreversibly	بشكل غير عكوس
isoelectric point	نقطة توازن الشحنات
isoglucose	الإيزوغلوكوز
isoleucie	إيزو ليوسين
isomerase	أنزيم مصاوغة (أيزوميراز)

isomerization	المصاوغة
kanamycin	الكنامايسين
karyogamy	الاندماج النووي
kasugamycin	الكاسوغامايسين
KDPG metabolic pathway	مسار ketodeoxyphosphogluconate الأيضي
keratinocytes	خلايا كيراتية
kiln	الأتون، الفرن
kimchi	كيمتشي
kinetic methods	الطرائق الحركية
Klenow fragment	شدفة كلينو/ Klenow
knock-in	مضاف إليها جين محدد
knockout	منقوصة جين محدد
koji	الكوجي
konbu	كونبو
Kuppfer cells	خلايا كوبفير
lac operon	أوبرون اللاكتوز
lacquer	البرنيق
lactamases	لاكتاماز
Lactic acid	حمض اللبن
lactic acid bacteria	بكتيريا حمض اللبن
lactic acid methyl ester	حمض لبن ميثيل الإستر
lactoferin	اللاكتوفيرين
lactofermentation	التخمر اللبني
lactonase	اللاكتوناز
lactone	لاكتون
lactose	اللاكتوز
lag phase	الطورَ المتأخرَ ـ طور الراحة

lamella	الطبقة الرقيقة، الصفيحة
layases	اللايازا
lead structure	البنية الأساسية (الفيصلية)
leader sequence	التسلسلات القائدة
leeches	العلّيق
leprosy	الجذام (البرص)
leptospira	الليبتوسبيرا
leucine	ليوسين
leukemia	اللوكيميا، أبيضاض الدم
lichens	اللشنيات، الحزاز أو بهق الحجر
lignin	ليغنين
Lime	الكلس
lincomycin	لينكومايسين
linear peptides	الببتيدات الخطية
lipase	والليباز
lipofection	الحقن الدهني
lipophilic	محبة للدهون
lipopolysaccharides	عديدات السكر الدهنية
liposme	الليبوزوم، الجسيم الدهني
lithotrophic	جمادية التغذية
loam	التربة المعالجة مكونة بشكل رئيسي من طين وطفالية
log phase	طورُ النمو المطرد ـ اللوغاريتمي
long bed bioreacters	المفاعلات الحيوية ذات القعر الطويل
long interspersed nuclear elements (LINE)	العناصر النووية المنتشرة الطويلة
long-chain polyhydroxy fatty acid	حمض دهني طويل السلسلة متعدد الهيدروكسيل
loop reactors	مفاعلات الدارة

low fatty acids	أحماض دهنية منخفضة
low-grade ores	الخامات المنخفضة المحتوى
luciferase	اللوسيفيراز
luminomeric	القياس اللمعاني
luteining hormone	هرمون اللُوتِن
lymphatic	لِمفية
lymphoblastoma	الورم الأرومي اللمفاوي
lyophilized	مجفدة
lysine	لايسين
lysogenic	محلحلي
lyzozyme	الليزوزايم
maceration	نقع، تعطين الكتان
macrocyclic lacton ring	حلقة اللاكتون الضخمة
macrocyclic lactone	اللاكتون الحلقي الضخم
macrocyclic lactone rings	حلقات لاكتون ضخمة
macrolactam rings	حلقات لاكتام ضخمة أو ماكروية
macrolide	الماكرولايد
macrophages	الخلايا البلعمية
macrotetrolide	الماكروتيترولايد
major histocomptability complex (MHC)	بجزيئات معقد التوافق النسيجي الأساسية
maleic acid	حمض الماليك
malo-lactic fermentation	تخمر المالو ـ لاكتيك
malonyl-CoA	المالونيل ـ كوA
malt	الملت: شعير مثبت في الماء لصنع الكحول
malting	التنبيت
maltogenic	المولد للمالتوز
maltotriose	المالتوترايوز

manipulation	التلاعب
mash	موورومي، هريس
mast cells	الخلايا البدينة
maxi-prep	بالتحضير الأقصى
measles	الحصبة
meiosis	الانقسام المنصّف أو الاختزالي
meiotic crossing over	التصالب في الانقسام المنصّف
melanoma	الميلانوم، الورم القتاميني
melle-Biont	عملية Melle-Biont
melting point	نقطة الانصهار
membrane bound enzymes	أنزيمات مرتبطة بالغشاء
membrane process	عملية الغشاء
membrane-bound proteases	البروتياز المرتبطة بالغشاء
mercaptans	ميركابتان
meristem	النسيج الإنشائي، أو المرستيمي ألمولد
mesenchymal	خلايا جذعية لُحمية متوسطية
mesophilic	المحبة لدرجات حرارة معتدلة
metabolic engineering	والهندسة الأيضية
metabolic flux	التدفق الأيضي
metabolies	المستقلبات
metabolome	المستقلبات في الحي ـ ميتابولوم
metaphase	الطور التالي
methane	الميثان
methanobacteria	بكتيريا الميثان
methicillin	ميثيسيلين
methionine	ميثيونين
methyl	الميثيل

methylation	إضافة مجموعة ميثيل
methylene bisacrylamide	سكريلاميد المثيلين الثنائي
methylene blue	أزرق الميثيلين ـ صبغة
methylotrophic	البكتريا الميثايلية التغذية
micelles	مُذَيّلات
micro total analysis system (mmm)-TAS	جهاز التحليل الكلي الدقيق
microbial flora	الفلورا الميكروبية
microbial leaching	الارتشاح الميكروبي
microbiology	علم الأحياء المجهرية
microencapsulation	والتغليف الميكروي
microinjection	الحقن المجهري
micropropagation	الإكثار الميكروي
microsatellite	توابع الـ DNA الدقيقة
microspotters	أجهزة وضع البقع الدقيقة
microsystem	النظم الميكروية
microtiter plates	أطباق معايرة دقيقة
millet	الدُخن، الجاورس، الذرة
mineralization	تمعدن
mini-prep	التحضير الأدنى
mini-proinsulin	بادئة إنسولين مصغرة
mitochondria	ميتوكوندريا ـ المتقدرة ـ
mitosis	الانقسام الفتيلي أو الخيطي
molassases	المولاس، دبس السكر
molds	الأعفان
mole	مول، وزن جزيئي غرامي في ليتر من المذيب
molecular biology	علم الأحياء الجزيئية
molecular sieves	مناخل جزيئية

molecular weight	وزن جزيئي
moloney mouse leukemia virus (MMLV)	فيروس لوكيميا الفأر المولوني
molybdenum	الموليبدنيوم
monensin	المونانسين
monkey myoblastoma virus (MMV)	فيروس الأرومة العضلية الورمي القردي
mono, dicarboxilic acids	أحاديات أو ثنائيات أحماض الكربوكسليك
monoclonal antibodies	أجسام مضادة وحيدة النسيلة
monocot or dicot	ثنائية أو أحادية الفلقة
monocytes	الخلايا الوحيدة
monogenetic disease	مرض ناجم عن مورث واحد
monooxygenases	وأنزيم الأكسجة الأحادية ـ مونوأكسيجيناز
monosaccharides	السكريات الأحادية
morula	التويتة
mRNA	الـ RNA الرسول
MS - MALDI-TOF	مطياف الكتلة MALDI-TOF
multi/pluripotent	خلايا متعددة القدرات
multi-copy gene cassettes	مجموعات الجينات المتعددة النسخ
multimers	عديد الأجزاء
multiple sclerosis	التصلب اللويحي المتعدد
multiplex PCR	تفاعل البوليمراز التسلسلي المضاعف
murien	الميورين
murine	فأري
mutagenesis	التطفير
mutation	طفرة
mycelium	الخيوط الفطرية المتشابكة ـ الميسيليوم ـ
mycoplasma	المايكوبلازما
mycosterol	المايكوستيرول

myeloic	نخاعية
myeloma cells	خلايا نخاع ورمية
Na-, Ca-gluconate	غلوكونات الصوديوم أو الكالسيوم
Na2 + -gluconates	غلوكونات الصوديوم
NADH	الـ NADH
naïve	اللمفاويات الغِرّ
nalidixc acid	حمض الناليديكسيك
nanotechnology	التقانة النانوية
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية
natural killer cells (NK)	الخلايا القاتلة الطبيعية
neomycins	النيومايسين
nephritic syndrome	التهاب الكلى
nephrotoxic	سمّيّة كلوية
neutralized	ناقل عصبي
neutralizing	المعطلة
neutrophilic granulocytes	العدلات المحبَّبَة
nick- translation	الترجمة المُشقَّقَة
nickel	النيكل
nisin	نيسين
nitrate	النيترات
nitrifying bacteria	بكتيريا النترتة
nitrite	النيتريت
nitroglycerol	النيتروغليسرول
NMR	الرنين المغناطيسي النووي
nonglycosylated	لا يحوي الغلايكوزيد
non-proteinogenic amino acids	الأحماض الأمينية غير المولدة للبروتينات

northern blot	وصمة نورثرن
nuclease	نيوكلياز
nucleaside	النيكليوزايد
nucleocapsid	القفيصة النووية
nucleoid	النيكلويد
nucleosides	النيوكليوزيدات
nucleotidases	أنزيمات تفكيك النيوكليوتيدات
nucleotides	نيوكليوتيدات
nystatin	النيستاتين
oil-in-water emulsifier	مستحلِب للزيت في الماء
oleic acid	حمض الأوليك
oligomers	قليلات الوحدات
omnipotent	كلية القدرة
omnipotent stem cells	الخلايا الجذعية الموجودة في كل مكان
oncogene	الجين الورمي
oncomouse	فأر الأورام
open reading frame (ORF)	إطار القراءة المفتوح
operon	مشغل حيوي (أوبيرون)
oral vaccination	التلقيح الفموي
organic solvents	المذيبات العضوية
organophosphate	فوسفات عضوي
osmolysis	تحللاً تناضحياً
osteoporosis	هشاشة العظام
oxaloacetic acid	الأوكسالواستيك
oxidative bacteria	البكتيريا المؤكسِدة
oxidative decarboxylation	عملية نزع كربون تأكسدية
oxidoreductases	أنزيمات الأكسدة والاختزال

oxoglutarate	أوكسوغلوتارات
oxygen radicals	جذور الأكسيجين الحرة
oxynitrases	الأوكسينيتراز
oxytetracycline	الأوكسيتتراسايكلين
pactinases	أنزيمات البكتينياز
palindrome sequence	تسلسلات متناظرة
papain	البابايين
papaya	البابايا
papillary	طبقة حُليمية
papilloma virus	فيروس البابيلوما
paramagnetic resonance	بالرنين الممغنط
parasite	طفيلي
parathyroid hormone	هورمون الغدة الدرقية الشبيهة
parenterally	عن طريق غير الفم
partially hydrolyzed	متحللة جزئياً
passive immunization	التمنيع السلبي
pasteurization	بسترة
pathogenic microorganisms	الكائنات المجهرية الممرضة
PCR	تفاعل البوليمراز التسلسلي
pectate	البيكتات
pectins	البكتين
PEG	الـ بولي إيثلين غلايكول
penams	بينام
penicillin	البنسلين
pentosan	البنتوزان
pentose	السكر الخماسي
pentose phosphate pathway	مسار فوسفات السكر الخماسي

pepstatin	البيبستاتين
peptidyl transferase	البيبتيديل ترانسفيراز
peptone	الببتون
perfusion cultures	مزارع التروية
periost flap	سديلة سمحاقية
periplasmic space	الفراغ المحيط بالغشاء البلازمي
pernicious animia	الأنيميا المميتة
peroxidases	البيروكسيداز
peroxisomes	البيروكسيزوم
persulfate	بيرسلفات
pervaporation	تبخر خارج الغشاء
pH	الرقم الهيدروجيني
phages	العاثيات
pharmacogenomics	استخدام الجينوم في الصناعات الصيدلانية
pharmacology	علم الأدوية
phenantrene	الفينانترين
phenol oxidase	الفينول أوكسداز
phenotype	النمط الظاهري
phenoxazinone	فينوكسازينون
phenylacetic acid	حمض فينيل الخل
phenylalanine	فينيل ألانين
phosphatases	أنزيمات تفكيك الفوسفات
phosphinothricine	والفوسفينوثريسين
phosphoamidite	الفوسفوأميديت
phosphodiester	ثنائي استر الفوسفور
phosphoenol pyrovate	الفوسفوإينول بيروفات
phosphoimager	مُصَوِّر الفوسفور

phospholipids	الدهون الفوسفورية
phosphorylation	الفسفرة
phosphothionates	الفوسفاثيونات
photocycle	الدورة الضوئية
photohormone	هرمون ضوئي
photolithographic	التصوير الليثوغرافي
photometric	القياس الضوئي
photosynthesis	التمثيل الضوئي
phototroph	ضوئية التغذية
phototrophic growth	النمو بالتغذية الضوئية
physiology	علم الوظائف
piezoelectric	كهروضغطي
pimaricin	بيماريسين
pipettes	ماصّات
pitch	القار
Pitchblende	أوكسيد اليورانيوم، معدن أسود لامع
plantibodies	أجسام نباتية
plantibodies	أجسام مضادة نباتية
plasmic membranes	الأغشية السيتوبلازمية
plasmid	البلازميد
plasmid profile	سيماء البلازميد
plasmogamy	الاندماج البلازمي
platelets	صفيحات الدم
plyoses	عديدات السكر
polar body	الجسم القطبي
polio	شلل الأطفال
polyA signal	إشارة متعدد الأدينين

polyacrylamide	البولي أكريلامايد
polyaromatic	عديدة الحلقات العطرية
polyaromatic hydrocarbons (PAH)	الهيدروكربونات المتعددة الحلقات العطرية
polyclonal antibodies	الأجسام المضادة عديدة النسيلة
polyene antibiotics	مضادات البوليين الحيوية
polyester	البولي إستر
polyether	بولي إيثر
polygenic	عديدة المورث
polyhedrin	البولي هيدرين
polyhydroxybutyric	متعدد الهيدروكسي بيوتيريك
polyhydroxylated peptide	ببتيد متعدد الهيدروكسيل
polyketide	البولي كيتايد
polylactides	متعدد حمض اللبن
polylacton	بولي لاكتون
polymerization	بلمرة
polymorphic	المتعدد الأشكال
polymycines	البولي مايسين
polyoses	عديدات السكر
polysaccharides	عديدات الساكاريد
porines	ثُقيبات معدلة
post-translation modifications	تعديلات ما بعد الترجمة
potassium pyrosulfite	بيروسلفيت البوتاسيوم
ppm	جزء بالمليون
preclinical phase	مرحلة ما قبل سريرية
precursors	مركبات سالفة
pregnenolone	البريغنينولون
preimplantation diagnostics (PID)	تشخيصات ما بعد الغرس

prephenic acid	حمض البريفينيك
prepolymers	البوليميرات الأولية
preproalbumen	بشكل بادئات ألبومين أولي
preproinsuline	بادئات إنسولين أولية
preprotein	بروتين أولي
primer	بادئ
probe	مسبر
progesterone	البروجيستيرون
progestins	البروجيستينات
proline	البرولين
promoter	محضض
propionate	البروبيونات
prosthetics	الجراحات الترقيعية
protease	أنزيم البروتياز
protein gap	الخلل البروتيني أو الفجوة البروتينية
protein liquid chromatography (FPLC)	الكروماتوغرافيا السائلة السريعة للبروتينات
proteogenic amino acids	الأحماض الأمينية المولدة للبروتينات
proteolytic	محلل للبروتين
proteome	البروتيوم
proteomics	دراسة البروتيوم
prothrombin	البروثرومبين
protons	البروتونات
protoplast	بروتوبلاست
protozoa	الأوليات
pseudocrystalline	زائف البلورة
pseudoplastic	مطاوعة زائفة
psycotropic	المحبة للبرودة

pullulan	البولان
pullulanases	البولولاناز
pulp	عجينة الورق
purification	تنقية
purine	البيورين
purity law	قانون النقاوة
pyrimidine	البايريميدين
pyrometallurgic	عمليات التعدين الحراري
pyruvate	بيروفات
quality control	ضبط النوعية
quantitative structure-activity relationships (QSAR)	العلاقات الكمية بين البنية والفعالية
rabies virus	فيروس داء الكلَب
racemase	راسيماز
racemic	راسمي
radioactive isotopes	النظائر المشعة
radioactive markers	الواسمات المشعة
radioimmunoassay (RIA)	المعايرة المناعية الاشعاعية
raffinose	الرافينوز
rational protein design	بالتصميم البروتيني المنطقي
reagents	الكواشف
receptors	مستقبلات
recessive gene	جين متنحي
reciprocally	تبادلياً
recognition sequence	بتسلسلات التمييز
recombinant	مأشوب
recovery	الاسترجاع

redox reactions	تفاعلات الخزلدة
reducing agents	عوامل اختزالية
reductive amination	مجموعة الأمين الاختزالية
regioselectivity	انتقائية الموقع
regioselectivity	إنتقائية من حيث الموقع
rennet	الرينيت
rennins	منفحة التجبين ـ الرينين ـ
reporter gene	الجين المُخبِر
reporter groups	مجموعات مبلِّغة
rerecemization	إعادة راسيمية
resolution	التبيان
respiratory chain	السلسلة التنفسية
restriction enzymes	أنزيمات الحصر
reteplase	الريتيبلاز
reticular layer	طبقة شبكية
retrogradation	تسلسل تراجعي
retroviruses	الفيروسات القهقرية
reverse genetics	الوراثة العكوسة
reverse osmosis	التناضح العكسي
reverse transcriptase	ناسخ عكسي
rhamnose	الرامنوز
rheumatoid arthritis	التهاب المفاصل الريثاني
rhodamine	الرودامين
riboflavin	الرايبوفلافين
ribonucleic acid	الحمض النووي الريبي
rickettsia	الركتيسيا
rifampicin	الريفامبيسين

rifamycin	الريفامايسين
risk group	مجموعة الخطورة
robots	الروبوتات
roller flasks	دوارق دحرجة
roquefort	اسم تجاري لأحد أنواع الجُبن
rye meal	طحين الزؤان أو الجاودار
saccharification	عمليات تحويل النشاء إلى سكر
salynomycin	السالينومايسين
satellite DNA	DNA تابع
sauekraut	طعام مُعد من ملفوف مخمرً
scaffold	سقالة
Schiff base	قاعدة شيف
scleroglucan	سكليروغلوكان
screening	الغربلة
scurvy	تلف للجلد والأوعية الدموية (الأسقربوط)
secondary metabolites	المستقلبات الثانوية
selection	الانتقاء
selenite	والسيلينيت
self-aspiring agitators	محركات هز ذاتية الحركة
self-pollination	التأبير الذاتي أو التلقيح الذاتي
semisynthetic	شبه مصنع
separator	فارز/ فاصل
septic shock	الصدمة الإنتانية
serine	السيرين
severe combined immunodeficiency (SCID)	العَوَز المناعي المشْتَرَكُ الوَخيم
shear	الجز، القص
shift	تحوُّل (إزاحة)

shigellosis	الإصابة بالشيغللا
shikimic acid	حمض الشيكميك
shikonin	الشيكونين
shock	الصدمة
short interspersed nuclear elements (SINE)	العناصر النووية قصيرة الانتشار
short stretches	وصيلات، تمديدات قصيرة
shotgun cloning	الكلونة بالقسرية
shuttle vectors	نواقل مكوكية
siderochromes	السايدوروكروم
signal transduction	انتقال الإشارات
silage	سيلاج (علف متخمر للماشية)
silos	مخازن الغلاّت
single cell protein (SCP)	بروتين الخلايا المنفردة
single DNA strands	جديلات الـ DNA المنفردة
single nucleotide polymorphism (SNP)	تعدد الأشكال بنيوكليوتيد مفرد
single-bolus	بجرعة واحدة
single-peak insuline	الإنسولين النقي
sisomicin	السيسوميسين
site-direct mutagenesis	التطفير الموجه في الموقع
sizing	المواد الغروية، تغرية
slant culture	المزارع المائلة
sludge	رسابة، حمأة
sodium sulfite	سلفيت الصوديوم
softener	ملطف
solvent	مذيب
somatic cell	خلية جسمية
somatic embryogenesis	تشكل الأجنة من الخلايا الجسمية

somatotropin	السوماتوتروبين
sophorose	السوفوروز
sorbitol	سوربيتول
sour milk	اللبن الحامض
sourdough	العجين المتخمر
southern blot	وصمة ساوثيرن
space-time yields	العطاءات الزمكانية
species-specific lactate racemase	أنزيم راسيماز اللاكتات الخاص بالنوع
specific growth rate	معدل النمو النوعي
specificity	النوعية
sphalerite	السفاليريت ـ التوتياء
spindle	مغزل
spinner flasks	دوارق غازلة
spiramycin	والسبيرامايسين
spirdroins	والسبايدروينات
spirochaeta	الحلزونيات أو الملتويات (شكل من أشكال البكتريا)
spironolactone	السبيرونولاكتون
splicing	عملية القطع والوصل
spores	الأبواغ
spotter	جهاز وضع البقع
spray drying	التجفيف بالرذاذ
stainless steel	فولاذ غير قابل للصدأ
standard	قياسي، معياري
starter	بادئة
starter culture	مزرعة بادئة
stationary phase	مرحلة الركود

stem cells	الخلايا الجذعية
stereo centers	مراكز فراغية
stereoselective	انتقائية من حيث الفراغية
steroids	الستيرويد
sterols	ستيرولات
sticky	لزج، دبق
stigmasterol	والستيغماستيرول
stout	الجعة القوية الداكنة
streak plate method	طريقة الأطباق المخطوطة
streptavidin	ستربتافيدين
strictly anaerobic	اللاهوائية الكجبرة
Structural biology	البيولوجيا البنيوية
subcutaneous	تحت الجلد
substrate	مركب أولي
subterminal oxidation	الأكسدة قبل النهائية
subterminal oxidation	أكسدة طرفية فرعية
subunits	وحدات فرعية
succinoyl COA	الساكسينويل كوA
sucrose	السكروز
sulfonated	المسلفنة
sulfonation	إضافة الكبريت
sulfuric acid	حمض الكبريت
sulphydryl group	مجموعة السلفيدريل
supermolecular double helix	مزدوج حلزوني فوق جزيئي
supernatant	طافي
superovulation	إباضة فائقة
surfactants	مخفضات التوتر السطحي

suspension	معلق
symbiosis	التكافل
synthons	سينثونات
Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEE	التطور المنظومي للربائط بواسطة الإغناء المطرد
systematic screening	الغربلة المنهجية
systems biology	بيولوجيا (علم أحياء) النظم
Taq Man	تاكمان
Taq polymerase	التاك بوليمراز
taxonomy	علم التصنيف
T-cells	الخلايا التائية
tekuila	عصير الصبار الأمريكي (تيكيلا)
template	قالب
terminal oxidase	الأوكسيداز الطرفي
terpene	التيربين
tertiary structures	البنيات الثلاثية
tet-proteins	بروتينات تيت
tetracycline	تتراسيكلين
tetrads	تحليل الرباعيات
tetramere	رباعي الأقسام
thallus	الثالوس
thermolysin	الثيرمولايزين
thermophilic	محبة للحرارة
thermostable	مستقر حرارياً
thiazine	الثايزين
threonine	ثريونين
threonine	والثريونين

thrombolytic agents	العوامل الحالة للخثرة
thymidine	الثايميدين
thymocytes	الخلايا التوتية
thymus	التيموس ـ الغدة الصعترية
titration	تسحيح
tobramycin	التوبراميسين
tolerability	التحمل
toluene	التولوين
topinambur	نبات الخرشوف
topoisomerases	المصاوغ المكاني ـ أنزيم التوبوأيزوميراز
tower biology	بيولوجية البرج
TPA	ومنشطات (مفعلات) البلازمينوجين النسيجي
trace elements	عناصر ضئيلة المقدار (أثرية)
transactylase	ترانسأستيلاز
transcutaneouse	عبر الجلد
transducer	محول طاقة
transfection	تعداء
transformation	تحويل، نقل
transgenic	محور وراثياً
transition metals	معادن انتقالية
transition phase	طور انتقالي
translation machinery	مكننة الترجمة
transplantation	الازدراع
transposons	عوامل وراثية قافزة
trehalose	التريهالوز
trehalose tetraesters	التريهالوز رباعي الإستر
trialkylphosphate	فوسفات ثلاثي ألالكيل

trickling filters	مراشح الجريان المتقطع
triglycerides	شحوم ثلاثية/ ثلاثي الغليسيريد
trilauoyl glycerol	الغليسيرول ثلاثي اللورويل
trilauryl amine	الـ trilauryl amine
trinitrotoluene (TNT)	الأمين ثلاثي اللوريل
trypsin	تريبسين
tryptophan	تريبتوفان
tuberculosis	مرض السل
tumour suppressor genes	جينات كابحة للورم
tungsten	التنجستين
turbidostat	نظم بالاعتماد على مستوى العكر
turn over rate	معدل تحويل
tylosine	التايلوسين
typhus	التيفوس
tyrosinase	التايروزيناز
tyrosine	تايروزين
udder epithelium	ظهارة ضرع
UDP muramyl pentapeptide	ببتيد المورامل الخماسي
ulcerative colitis	التهاب القولون التقرحي
ultrafiltration	الترشيح الفائق
ultrasonication	الأمواج فوق الصوتية
unicellular organisms	الكائنات وحيدة الخلية
uranum	اليورانيوم
urease	أنزيم اليورياز
vaccination	التلقيح
valinomycin	الفالينومايسين
vancomycin	الفانكومايسين

variable numbers of tendem repeats (VNTR)	أعداد مختلفة من الإعادات العشوائية
vasectomized	مستئصل الأسهر
vegetatively	النمو النباتي
viral encephalitis	الالتهاب الدماغي الفيروسي
virginiamycin	الفيرجيناما يسين
virulence	الخبث، الأمراضية
volume-space yield	العطاء من المنتج بالنسبة إلى الحجم والفراغ
vortex drier	مجفف دوَّام
weft	اللُّحمة، قماش
western blot	وصمة وسترن
whooping cough	السعال الديكي
wort	نقيع الملت
wrap	السداة، دثار
xenobiotics	المواد الغريبة (الدخيلة)
xenotransplantation	الزرع الغريب
xidoreductase	أنزيمات الأكسدة والاختزال
XMP	كزانثوزين أحادي الفوسفات
yeast artificial chromosome (YAC)	كروموسومات الخميرة الصناعية
yeast dough	عجينة الخمير
yeast episomal plasmid (YEP)	بلازميدات الخميرة الإيبيزومية
yeast integrating plasmid (YIP)	بلازميدات الخميرة المندمجة
yields coefficients	مكافئات العطاء
zona pellucida	الباحة الصافِية
zygote	الزيجوت
zymogen	الزايموجين
α1-antitrypsin	مضاد التريبسين ألفا 1
α-acetolactate decarboxylase	ألفا ـ أسيتولاكتات دي كاربوكسيلاز

β - interferon	الإنترفيرون ـ بيتا
β-galactosidase	بيتا ـ غالاكتوزيداز
β-glucanase	بيتا ـ غلوكاناز
β-subunit	بوحدة بيتا الفرعية

المراجع

References

لقد اعتمد في هذا الدليل على حشد هائل من المعلومات استقيت من كتب، ومراجعات ونشريات دورية إضافة إلى الاستشارات الشخصية. وأنها، لكثرتها استحال علينا أن ننسبها إلى مصادرها أو نعرضها بكليتها هنا.

ولكن، لضمان مصلحة القارئ، ارتأينا أن نورد مختارات من هذه المقتبسات، قد لا تزيد على 600 مصدر ومرجع نُظِّمت بما يتناسب وتسلسل المعلومات في الفصول المنوّه عنها في مداخل هذا الدليل. فضلاً عن سلسلة الكتب الاسترشادية والمجلات المرجعية التالية:

- *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 4th Edition, InterscienceWiley
- *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5th Edition, Wiley-VCH
- *Advances in Biochemical Engineering*, Springer-Verlag
- *Biotechnology -A Comprehensive Handbook*, 2nd Edition, Wiley-VCH
- *Current Opinions in Biotechnology*, Current Biology Publications
- *Current Opinions in Microbiology*, Current Biology Publications
- *Current Opinions in Structural Biology*, Current Biology Publications
- *Current Opinions in Genetics and Cell Biology*, Current Biology Publications
- *Trends in Biotechnology*, Elsevier Publishers

ومما لا يخفى أن الإنترنت باتت معيناً ثرّاً للمعلومات العلمية. ولكن نظراً إلى عدم توفر الضمانات بثبات هذه المواقع أو عناوينها، أرتأينا عدم ذكر هذه العناوين في متن هذا الدليل

الكتب المقررة — Text books

H.J. Rehm, G. Reed, A Pühler, P. Stadler, eds., *Biotechnology* -A *Multi-Volume Comprehensive Treatise 2*nd ed. Wiley-VCH, ISBN 1-56081-602-3.

B. Atkinson and F. Maviura (1991). *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*. 2nd Edition. Mamillan Publishers. ISBN 1-56159-012-6.

J. Black (1999) *Microbiology -Principles and Explorations*, 4th ed., Prentice Hall. ISBN 0-13-920711-2.

T. Brown (2001) *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*, 4th ed. Blackwell Science Inc, ISBN 0-9320-5901-X.

T. Brown (1999).*Genomes*. John Wiley & Sons, ISBN 1-85996-201-7.

B. Dixon (1996). *Power Unseen: How Microbes Rule the World*, W. H. Freeman, ISBN 07167-4550-X

A. Demain, J Davies (1999) *Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2nd ed. ASM Press, ISBN 1-55581-128-0.

B. R. Glick, J. J. Pasternak (1998) *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinat DNA*. 2nded. Amer. Society for Microbiology, ISBN 1-55581136-1.

A. L. Lehninger, D.L. Nelson, M.M. Cox (2000).*Principles of Biochemistry*. 3rd ed., Worth Publishing, ISBN 1-5725-9931-6.

J. Lengeler, G. Drews, H. Schlegel (1999). *Biology of the Prokaryotes Thieme*, 3-13108411-1

P. Prave, U. Faust, W. Sittig, D. Sukatsch (1987).*Fundametals ofBiotechnology*, VCH Publishing, ISBN 0-8957-3224-6.

L. Stryer (1995). *Biochemistry*, 4th ed. W. H. Freeman and Co., ISBN 0-71673687-X G Walsh, D Headon (1994). *Protein Biotechnology*. John Wiley & Sons, ISBN 0-471944396OP Ward (1989).*Fermentation Biotechnology: Principles; Processes, and Products*, Prentice Hall, ASIN 0-1331-5052-6.

J. Watson, M. Gilman, J. Witkowski, M. Zoller (1992) *Recombinant DNA*, 2nd ed. Scientific American Books, ISBN 0-7167-2282-8.

Fermented food **الطعام المخمر**

M. Saarela, G. Mogensen, R. Fonden, J. Matto, T. Mattila-Sandholm (2000). «Probiotic bacteria: Safety, Functional and Technological Propelties.» *Journal of Biotechnology*, vol. 84, p. 197.

A. Forde, G. F. Fitzgerald (2000). «Biotechnological Approaches to the Understanding and Improvement of Mature Cheese Flavour.» *Current Opinion in Biotechnology*, 484.

D. B. Archer (2000), «Filamentous Fungi as Microbial Cell Factories for Food Use.» *Current Opinion in Biotechnology*, 478.

H. Fleming, K. Kyung, F. Breidt (1995).*Vegetable Fermentations in Biotechnology* 2nded. 629. Vol. 9, G. Reed, T. Nagodawithana (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3527-28319-6.

R. Shaver, K Batajoo (1995).*Fermented Feeds and Feed Products* in *Biotechnology* 2nd Edition, 769. Vol. 9, G. Reed, T. Nagodawithana (ed.). VCR-Wiley; ISBN 3˜527.

L. Beuchat (1995) *Indigenous Fermented Foods in Biotechnology*. 2nd Edition, 505. Vol. 9, GReed, T Nagodawithana (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-527-28319-6.

N. Olson (1995) *Cheese in Biotechnology*. 2nd Edition, 353. Vol. 9, GReed, T Nagodawithana (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3527-28319-6.

G. Burkhalter, C. Steffen, Z. Puhan (1986).*Cheese, Processed Cheese, and Whey* in *Ullmann's Encyclopedia of IndustrialChemistry*. 5th edition A6, 163. Wiley-VCR, ISBN 3-527-20106-8.

Food and lactic acid fermentation **الطعام وتخمر حمض اللبن**

R.P. Ross, S. Morgan, C. Rill (2002). «Preservation and Fermentation: Past, Present and future.» *International Journal of Food Microbiology*: vol. 79, p. 3.

M. Teuber (1993) *Lactic Acid Bacteria in Biotechnology Second*, Completely Revised Edition, 325. Vol. 1, R.Sahm (ed.). VCR Verlagsgesellschaft, ISBN 3527-28337-4.

Ethanol **الإيثانول**

M. Galbe, G. Zacchi (2002). «A Review of the Production of Ethanol from Softwood.» *Applied Microbiology and Biotechnology:* vol. 59, p. 618.

M. J. Davies (2001). «Corn-to-car» Ethanol Production.» *Trends in Biotechnology*: vol. 19, p. 380.

A. E. Wheals, L.C. Basso, D. M. Alves, H. V. Amorim (1999), «Fuel Ethanol after 25 years.» *Trends in Biotechnology*: vol. 17, 482

C.S. Gong, N.J. Cao, J. Du, G.T. Tsao (1999). «Ethanol Production from Renewable Resources.» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*: vol. 65, p. 207.

N. Kosaric (1996) *Ethanol -Potential Source of Energy and Chemical Products* in *Biotechnology*. 2nd Edition, 121. Vol. 6, M. Roehr (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-52728316-1

T. Senn, R. Pieper (1996) *Ethanol -Classical Methods in Biotechnology*. 2nd Edition, 5. Vol. 6, M Roehr (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-527-28316-1

J. Logsdon (1994). *Ethanol* in Kirk-Othmer. *Encyclopedia of Chemical Technology*. 4th Edition 9, 812. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52677-0

B. Maiorella, R. Blanch, C. Wilke (1984). «Biotechnology Report: Economic Evaluation ofAlternative Ethanol Fermentation Processes.»*Biotechnology and Bioengineering:* vol. 26, p.1003.

l-Butanol, acetone **١-بيوثانول والأسيتون**

P. Durre, M. Bohringe, S. Nakotte, S. Schaffer, K. Thormann, B. Zickner (2002). «Transcriptional Regulation of Solventogenesis in Clostridium Acetobutylicum.» *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*: vol. 4, 295.

P. Durre, R. Bahl (1996). *Microbial Production of Acetone/Isopropanol* in Biotechnology. 2nd Edition. 229. Vol. 6, M. Roehr (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28316-1

P. Durre, R. Fischer, A. Kuhn, K. Lorenz, W. Schreiber, B. Sturzenhofecker, S. Ullmann, K. Winzer, U. Sauer (1995), «Solventogenic Enzymes of Clostridium Acetobutylicum: Catalytic Properties, Genetic Organization, and Transcriptional Regulation.» *FEMS Microbiology*: vol. 17, p. 251.

Acetic acid/vinegar **حمض الخل/ الخل**

S. Arnold, T. Becker, A. Delgado, F. Emde, A. Enenkel (2002). «Optimizing High Strength Acetic Acid Bioprocess by Cognitive Methods in an Unsteady State Cultivation.» *Journal of Biotechnology*: vol. 97, 133.

H. Ebner, S. Sellmer, H. Follmann (1996).*Acetic Acid in Biotechnology*. 2nd Edition, 381. Vol. 6, M Roehr (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28316-1.

H. Ebner, H. Follmann, S. Sellmer (1996) *Vinegar in UIlmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 5th edition *A27*, 403. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20127-0

H. Ebner, H. Follmann, S. Sellmer (1995) *Vinegar in Biotechnology*. 2nd Edition, 579. Vol. 9, G. Reed, T. Nagodawithana (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28319-6

Citric acid **حمض الليمون**

L. Karaffa, E. Sandor, Fekete, A Szentirmai(2001). «The biochemistry of Citric Acid Accumulation by Aspergillus Niger.» *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*: vol. 48, p. 429.

M. Roehr, C. Kubicek, J. Kominec (1996) *Citric Acid* in Biotechnology 2nd Edition, 307. Vol. 6, M Roehr (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28316-1

G. Blair, P. Staal (1993) *Citric Add* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 6, 354. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52674-6

F. Verhoff (1986) *Citric Acid* in Ullimann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 5th edition A7, 103. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20107-6

M. Roehr, C. Kubicek, J. Kominek (1996) *Gluconic Acid* in Biotechnology 2nd Edition, 347. Vol. 61 M Roehr (ed.). VCH

M. Roehr, C. Kubicek. J. Kominek (1996). *Further Organic Acids* in Biotechnology 2nd Edition, 363. Vol. 6, M Roehr (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28316-1

R. Datta (1995).*Hydroxycarboxylic Acids in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 4th Edition 13, 1042. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52682-7

S. Chahal (1990) *Lactic Acid in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 5th edition A15, 97. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20115-7

H. Hustede, H-J. Haberstroh, E. Schinzing (1989).*Gluconic Acid in UIlmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 5th edition A12, 449. Wiley-VCH, ISBN 3527-20112-2

Amino acids **الأحماض الأمينية**

W. Leuchtenberger (1996).*Amino Adds Technical Production and Use in Biotechnology*. 2nd Edition, 465. Vol. 6, M. Roehr (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-52728316-1

N. Esaki, S. Nakamori, T. KUrhara, S. Furuyoshi, K. Soda (1996). «Enzymology ofAmino Acid Production,» in: *Biotechnology*. 2ndEdition, 503. Vol. 6, M. Roehr (ed.).VCH-Wiley, ISBN 3-527-28316-1

K. Araki (1992).*Amino Acids,Survey*, in: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 4th Edition 2, 504. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52669-X

A. Kleemann, W. Leuchtenberger, B. Hoppe, H. Tanner (1985).*Amino Acids* in lTIlmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 5th edition A2, 57. Wiley-VCR; ISBN 3-527-20102-5

L-Glutamic acid **حمض الغلوتاميك - L**

P. G. Peters-Wendisch, B. Schiel. V. F. Wendisch, E. Katsoulidis, B. Mockel, H. Sahm, B. J. Eikmanns (2001) «Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by Corynebacterium glutamicum.» *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*: vol. 3, 295

T. Kawakita (1992). «L-Monosodium Glutamate.» In: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 4th Edition 2, 571.Interscience-Wiley. ISBN 0-471-52669X

T. Kawakita, C. Sano, S. Shioya. M. Takehara, S. Yamaguchi (1990). *Monosodium Glutamate* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 5th edition A16. 711. WileycVCH, ISBN 3-52720116-5

Methionine, L-Iysine, L-threonine **ميثونين، اللايسين -L، والثريونين، L**

J. Ohnishi. S. Mitsuhashi. M. Hayashi. S. Ando. H. Yokoi. K. Ochiai. M. Ikeda (2002). «A novel methodology employing Corynebacterium glutamicum genome information to generate a new Llysine-producing mutant.» *Applied Microbiology and Biotechnology*: vol. 58, p. 217.

A. A. de Graaf, L. Eggelin, H. Sahm (2001).» Metabolic engineering for L-Iysine production byCorynebacterium glutamicum.»*Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*: vol. 73, p. 9.

Aspartame, t-phenylalanine, and t-aspartic acid **الأسبارتام، الفنيل الانين- L وحمض الأسبارتيك -L**

D. Kuhn, P. Durrschmidt, J. Mansfeld, R.Ulbrich-Hofmann (2002). «Boilysin and thermolysin in dipeptide synthesis: acomparative study.» *Biotechnology and Applied Biochemistry*: vol. 36, p. 71.

J. Fry, The world market for intense sweeteners (1999). *World Rev Nutr Diet*. 85, p. 201

T. Sato, T. Tosa T.Production of L-aspartic acid (1993). *Bioprocess Technol*. Vol. 16, 15

Amino acids via enzymatic transformation **أحماض أمينية منتجة بواسطة التحويلات الأنزيمية**

A. Bommarjus, M. Schwarm, K. Drauz (2001). «Comparison of Different Chemoenzymatic Process Routes to Enantiomerically Pure Amino Acids.» *Chimia* vol. 55, p. 50.

H. Griengl, H. Schwab, M. Fechter (2000). «The synthesis of chiral cyanohydrins by oxynitrilases.»*Trends in Biotechnology*: vol. 18, p.252.

Antibiotics: occurrence, application, mechanism of action **مضادات الحيوية: وجودها تطبيقاتها وآلية عملها**

D. Borders (1992) *Antibiotics, Survey* in: KirkOthmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 2, 893. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52669-X

G. Cauwenbergh (1992) *AntiparaSitic Agents, Antimycotics* in Kirk-Othmer Encyclopedia. of Chemical Technology 4th Edition 3, 473. Intersciel1ce-Wiley, ISBN 0471-52671-1

M. Plempel, H. Bbshagen, J. McGuire (1985). *Antimycotics* in Ullmann's Encyclopedia ofIndustrial Chemistry. 5th edition A3 77. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20103-3

M Ohno, M Otsuka. M. Yagisawa, S. Kondo H. Oppinger, H. Hoffmann, D. Sukatsch, L Hepner. C Male (1985) *Antibiotics* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 5th edition A2, 467. Wiley. VCH, ISBN 3-527-20102-5.

Antibiotics: industrial production resistance **مضادات الحيوية، الإنتاج الصناعي، المقاومة**

A. Dessen, A. M. Di Guilmi, T. Vernet, O.Dideberg (2001).»Molecular mechanisms of antibiotic resistance in gram-positive pathogens.» *Curr Drug Targets Infect Disord*. Vol. 1, p. 63.

K. Chater, M. Bibb (1997) *Regulatian of Bacterial Antibiotic Production* in Biotechnology2nd Edition, 57. Vol. 7. Hv. Dbhren H. Kleinkauf (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3 527-28310-2

Hv Döhren, U Gräfe (1997) *General Aspects of Secondary Metabolism* in Biotechnology 2nd Edition, 1. VoL 7; Hv. Döhren.

H. Kleinkauf (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3Diet527-28310-2

Beta lactam antibiotics: Structure biosynthesis mechanism of action **مضادات بيتالاكتام الحيوية : البنية التصنيع الحيوي وآلية العمل**

P. Moreillon and J. M. Entenza(2001). «Antibiotic resistance: learning from animal feeds and animal experimentation.»*Clinical Microbiology and Infection*, 7 Suppl 5, p. 13.

J. F.Martin (1998). «New aspects of genes and enzymes for beta-Iactam antibiotic biosynthesis.» *Applied Microbiology and Biotechnology*: vol.50, p. 1

K. Lindner, D. Bonner, W. Koster (1992) *Monobactams* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 4th Edition 3, 107. Interscience-Wiley, ISBN 0471-52671-1

J. Roberts (1992) *Cephalosponns* in Kirk Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 4th Edition 3, 28. Interscience-Wiley, ISBN 0471-52671-1

R. Southgate, N. Osborne (1992) *Carbapenems and Penems* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 3, 1,. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52671-1

β- Lactam antibiotics: manufacture **مضادات بيتالاكتام الحيوية : التصنيع**

M. A. Wegman, M.B.A Janssen, F. van Rant-wijk, R.A. Sheldon (2001), «Towards Bio-catalytic-Synthesis of â-Lactam Antibiotics.»*Advanced Synthesis and Catalysis*: vol. 343, p. 559

Evan de Sandt, E. de Vroom (2000), «Innovations in cepahalosporin and penicillin production: painting the antibiotics industry green.» *Chimica OGGI*, 72.

M. A. Penalva, R. T. Rowlands, G. Turner(1998), The optimization of penicillin biosynthesis in fungi *Trends in Biotechnology*: vol. 16, p. 483,

P. Skatrud, T. Schwecke, Hv. Liempt, M To-bm (1997) *Advances in the Molecular Ge-netics of p-tactam Antibiotic Biosynthesis*in Biotechnology 2nd Edition, 247.Vol. 7, Hv Döhren, H Klein-kauf (ed.).VCH-Wiley, *ISBN 3-527-28310-2*

Aminoacid and peptide antibiotics **مضادات الحيوية من الأحماض الأمينية والببتيدات**

H Kleinkauf, Hv. Döhren (1997).*PeptideAntibiotics* in Biotechnology 2nd Edition, 277. Vol. 7, Hv. Dohren, H. Klein- kauf (ed.), VCH-Wiley, ISBN 3-52728310-2.

مضادات الحيوية من الببتيدات السكرية والبولي إيثر، والنيكليوزايدات Glycopeptide, polyether and nucleoside antibiotics

A. Srinivasan, J. D. Dick, T. M. Perl (2002).»Van-comycin resistance in staphylococci,»*Clinical Microbiology Reviews*: vol. 15, p. 430.

J. Kallen, V. Mikol, V. Quesniaux, M. Walkinshaw, E. Schneider-Scherzer, K. Schorgendorfer, G. Weber, H. Fliri (1997).*Cyclosporins: Recent Developments in Biosynthesis, Pharmacology and Biology, and Clinicla Applications* in Biotechnology 2nd Edition, 535. Vol. 7, Hv. Döhren,H. Kleinkauf (ed.), VCH-Wiley, ISBN 3-527-28310-2

مضادات الحيوية من الغلايكوزيدات الأمينية Aminoglycoside antibiotics

W. Piepersberg, J. Distler (1997) *AminoglycoComsides and Sugar Components in Other Sec*ondary *Metabolites* in Biotechnology 2nd Edition, 397. Vol. 7, Hv D6hren, H Kleinkauf (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28310-2.

مضادات الحيوية من التتراسيكلين، والشينون والشينولون، ومضادات عطرية أخرى
Tetracyclines, chinones and other aromatic antibiotics

U.Grafe, K. Dornberger, H. Salz (1997) *Biotechnical Drugs as Antitumor Agents* in Biotechnology. 2nd Edition, 641. Vol. 7, Hv. Dohren, H. Kleinkauf (ed.). VCH-Wiley, ISBN *3-527-28310-2*

J. Hlavka, G. Ellestad, I. Chopra (1992) *Tetracyclines* in Kirk-Othmer Encyclopediaof Chemical Technology 4th Edition 3,331. Interscience-Wiley, ISBN 047152671-1

T. Nagabhushan, G. Miller, K. Vanna (1992) *Chloramphenicol and Analogues* in Kirk Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 2, 961. Inter science-Wiley, ISBN 0-471-52669-X

مضادات الحيوية من الماكرولايد Macrolide antibiotics

H. Kirst (2001) *Antibiotics, Macrolides* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 3; 169. Intersdence-Wiley, ISBN 0471-52671-1

P. Zhong, V. Shortridge (2001). «The emerging new generation of antibiotic: ketolides.» *Curr Drug Targets Infect Disord.* Vol. l, p. 125.

مضادات جديدة لمضادات الحيوية New pathways to antibiotics

R. Gokhale, D. Tuteja (2001). *Biochemistry of Polyketide Synthases* in Biotechnology 2nd Edition, 341. Vol. 10, H. Rehm(ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28320-X

Y. Xue, D. H. Sherman (2001). «Biosynthesis and combinatorial biosynthesis of pikromycin-related macrolides in Strepto-myces venezuelae.»*Metabolic Engineering*: vol. 3, p. 15.

M. Chaltrain, P. M. Salmon, D. K. Robinson, B. C. Buckland (2000). «Metabolic engineering and directed evolution for the production of pharmaceuticals.» *Current Opinion in Biotechnology*: vol. 11, p. 209.

Vitamins **الفيتامينات**

R. D. Hancock, R. Viola (2002), «Biotechnological approaches for L-ascorbicacid production,»-Trends Biotechnol: vol. 20, p. 299.

S. Shimizu (2001) *Vitamins and Related Compounds: Microbial Production inBiotechnology*. 2nd Edition, 319. vol. 10, H. Rehm (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527 - 28320-X.

V. Kuellmer (2001) *Ascorbic Acid* in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 4th Edition 25, 17. Inter-science-Wiley, ISBN 0-471-52694-0.

J. Scott (1998)*Vitamins, Survey* in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 4th Edition25,1. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52694-0.

F.Yoneda (1998) *Riboflavin(B2)* in: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical technology*. 4th Edition 25, 132. Inter-science-Wiley, ISBN 0-471-52694-0.

J. Scott (1998) *Vitamin B12* in *Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology*. 4th Edition 25, 193. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52694-0.

M. Eggersdorfer, G. Adam, M. John, W. Hahnlein, L. Labler, K-U. Baldenius, L. Bussche-Hunnefeld, E.Hilgemann, P. Hoppe, R. Sturmer, F. Weber, A. Ruttimann, G. Moine, H-P. Hohmann, R. Kurth, J. Paust, H. Pauling, B-J. Weimann, B. Kaesler, B. Oster, U. Fechtel, K. Kaiser, B. Potzolli, M. Casutt, T. Koppe, M. Schwarz. U. Hengartner, A. Saizieu, C. Wehrli, R. Blum (1996) *Vitamins* in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 5th edition A27, p. 443. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20127-0.

Nucloside and nucleotides **النيوكليوزيدات والنيوكليوتيدات**

A. Kuninaka (1996) *Nucleotides and Related Compounds* in *Biotechnology* 2nd Edition, 561. vol. 6. M. Roehr (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28316-1.

R. Suhadolnik, N. Reichenbach (1992) Nucleosidesand Nucleotides in: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 3, p. 214. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52671-1.

Biosurfactant and biocosmetic **مخفضات التوتر السطحي ومستحضرات التجميل**

R.S. Makkar, S.S. Cameotra (2002). «An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications.»*Applied Microbiology and Biotechnology*, vol.58, p. 428.

E.Z. Ron. E. Rosenberg (2001). «Natural roles of biosurfactants Environ.» *Microbiology*, vol. 3, p. 229.

I.M. Banat, R.S. Makkar, S.S. Cameotra (2000), Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 53, p. 495.

N. Kosaric (1996) *Biosurfactants in Biotechnology*. 2nd Edition, 659. Vol. 6, M. Roehr (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527 28316-1.

U.A. Ochsner, T. Hembach, A. Fiechter(1996), «Production ofrhamnolipid biosurfactants.»*Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*: vol. 53, p. 89.

Microbial polysaccharides **عديدات السكاريد الميكروبية**

R. van Kranenburg, I.C. Boels, M.Kleerebezem, W.M.de Vos(1999), «Genetics andengineering of microbial exopolysac-charides for food: approaches for theproduction of existing and novel polysaccharides.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 10, p. 498.

I.Sutherland (1998), Novel and established applications of microbial polysaccharides *TIBTech* 16, p. 41.

A. Becker, F. Katzen, A. Puhler, L. lelpi (1998) «Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective.»*Applied Microbiology and Biotechnology*, vol 50, p.145.

I. Sutherland (1996) *Extracellular Polysaccharides* in Biotechnology 2nd Edition,613. Vol. 6, M Roehr (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28316-1

G. Cote, J. Ahlgren (1995) *Microbial Polysaccharides* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 16, 578. Interscience-Wiley, ISBN 0471-52685-1

Biomaterials **المواد الحيوية**

A. Steinbuchel, S. Hein (2001), «Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms.» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*: vol. 71, p. 81.

M. B. Hinman, J. A. Jones, R. V. Lewis (2000), «Synthetic spider silk: a modular fiber.» *Trends in Biotechnology*: vol. 18, p.374.

I. Y. Galaev, B. Mattiasson (1999), ««Smart» polymers and what they could do in biotechnology and medicine.» *Trends in Biotechnology*: vol. 17, p. 335.

D. Oesterhelt (1998), «The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea.» *Current Opinion in Structural Biology*: vol. 8, p. 489.

H. Heslot (1998). «Artificial fibrous proteins:a review.» *Biochimie*: vol. 80, p. 19.

G. Braunegg, G. Lefebvre, K. F. Genser (1998). «Polyhydroxyalkanoates. biopolyesters from renewable resources:physiological and engineering aspects.» *Journal of Biotechnology*: vol. 65, p. 127.

S. Fahnestock and L. Bedzyk (1997). «Production of synthetic spider dragline silk protein in Pichia pastoris.» *Applied Microbiology and Biotechnology:* vol. 47, p. 33.

A.Steinbüchel (1996). *PHB and Other Polyhydroxyalkanoic Adds* in Biotechnology 2nd Edition. 403. Vol. 6, M. Roehr (ed.). VCR-Wiley. ISBN 3-527-28316-1

A. Salerno and I. Goldberg (1993). «Cloning, expression and characterization ofa synthetic analog to the bioadhesive precorsor protein of the sea mussel Mytilus edulis.»*Applied Microbiology and Biotechnology:* vol. 39, p. 221.

Biotransformation **التحويل الحيوي**

J. Schrader and R. Berger (2001).*Biotechnological Production* of *Terpenoid Flavor and Fragrance Compounds* in Biotechnology. 2nd Edition. 373. Vol. 10, H. Rehm (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28320-X.

U.Bornscheuer (2000) *Industrial Biotranformations* in Biotechnology 2nd Edition 277. Vol. 8b. D Kelly (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-527-28324-2

K. Faber (2000).*Biotransfonnations in Organic Chemistry*. 4th ed., SpringerVerlag, ISBN 3-540-66334-7.

A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey (2000).*Industrial Biotransfonnations*. Wiley-VCR, ISBN 3-527-30094-5.

J. Rabenhorst (2000).*Biotechnological Produc*tion of *Natural Aroma Chemicals by Fermentation Processes* in Biotechnology 2nd Edition, 333. Vol. 8b, D. Kelly (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-527-28324-2.

B. Schulze, M. G. Wubbolts (1999), «Biocatalysis for industrial production of fine chemicals.» *Current Opinion in Biotechnology:* vol 10, p. 609.

D.Kelly (1999). *Biotransfonnations -Practical Aspects* in Biotechnology 2nd Edition, 25. Vol. 8a, D. Kelly (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-527-30104-6

M. Turner (1997).*Perspectives in Biotransformation* in Biotechnology 2nd Edition, 5. Vol. 8a, D Kelly (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-527-28318-8.

S. Shimizu,J.Ogawa, M. Kataoka, M. Kobayashi (1997), «Screening of novel microbial enzymes for the production of biologically and chemically useful compounds.» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology:* vol. 58, p. 45.

M. Turner (1999) *Biotransformations -Practical Aspects* in Biotechnology. 2nd Edition, 25. Vol. 8a, D Kelly (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-527-30104-6.

O. Sebek and J. Rosazza (1995).*Microbial Transfonnations* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 4th Edition 16, 611. Interscience-Wiley. ISBN 0-471-52685-1

J. Prenosil, Ö. Kut, I. Dunn, E. Reinzle (1989) *Immobilized Biocatalysts* in Ullmann's Encyclopedia ofIndustrial Chemistry. 5th edition A14. 1. Wiley-VCR, ISBN 3-52720114-9

Steroid biotransformation **التحولات الحيوية للستيرويد**

C. Duport, R. Spagnoli, E. Degryse, D. Pompon (1998) «Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast.» *Nature Biotechnology*: vol.16, p. 186.

R.Müller (1994). *Steroids* in Ullmann's Encyclopedia Chemistry 5th edition A25, 309. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20125-4.

Enzymes **الأنزيمات**

S. Miot and J. Boulay (2001). «Protein technologies and commercial enzymes.» *Current Opinion in Biotechnology*: vol.12, p. 329.

A. Curtis (2000).*Carbon-Carbon Bond FonnationUsing Enzymes* in Biotechnology 2nd Edition, 5. VoL 8b, D. Kelly (ed.). VCRWiley, ISBN 3-527-28324-2.

Flintsch,G.Watt (2000) *Enzymes in Carbohydrate Chemistry: Formation* of *Glycosidic Linkages* in Biotechnology 2nd Edition. 243. VoL 8b, D Kelly (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-527-28324-2.

D. Kelly, J. Mahdi (2000) *Lyases* in Biotechnology 2nd Edition, 41. Vol. 8b, D. Kelly (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-527-28324-2.

G.Robinson, S. Jackman, J. Stratford (2000).*Halocompounds* in Biotechnology 2nd Edition, 173. Vol. 8b, D Kelly (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-527-28324-2.

J. M. Woodley (2000). Advances in epzyme technology-UK contributions.» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*: vol.70, p. 93.

H. Holland (1999).*Hydroxylation and Dihy- Pharmadroxylation* in Biotechnology 2nd Edition, 475. Vol. Sa, D Kelly (ed.). VCH Wiley, ISBN 3-527-30104-6.

D. Hoople (1999).*Cleavage and Formation ofAmide Bonds* in Biotechnology 2nd Edition, 243. Vol. Sa, D Kelly(ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-30104-6 Wiley, ISBN 3-527-30104-6.

K. Foster, S. Frackman and J. Jolly (1995) *Production of Enzymes as* Fine *Chemicals* in Biotechnology 2nd Edition, 73. Vol. 9, G Reed, T Nagodawithana (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28319-6

R. Scopes (1994) *Protein Purification PrindpIes and Practice*, 3rd Edition ed., Springer-Verlag, ISBN 0-387-94072-3.

R. Perham, M. Grassl, G. Michal, B. Rexer, A. Scheltinga, C. Gölker, S. Fukui, A. Tanaka, H. Uhlig, W. Goldstein, H. Hagen, S. Pedersen, B. Poldermans, E. Reimerdes, W. Leuchtenberger, U. Plöcker, H. Waldmann, G. Whitesides, G-B Kresse, K. Wulff, G. Henninger, L. Flohté, W Günzler, C. Kessler, K. Aunstrup (1987) *Enzymes* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition A9, 341.Wiley-VCH, ISBN 3-527-20109-2

Enzyme catalysis التحفيز الأنزيمي

K. Jaeger and T. Eggert (2002), «Lipases for biotechnology.» *Current Opinion in Biotechnology*: vol. 13, p. 390.

S. Fetzner (2002) «Oxygenases without requirement for cofactors or metalions.» *Applied Microbiology and Biotechnology*: vol. 60, p. 243.

S. Panke, M. G. Wubbolts (2002), «Enzymetechnology and bioprocess engineering.» *Current Opinion in Biotechnology*: vol. 113, p.111.

A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer [et al.] (2001).»Industrial biocatalysis todayand tomorrow.» *Nature:* vol.409, p. 258.

J. McGregor-Jones (2000). *Synthetic Applications of Enzyme-Catalyzed Reactions* in Biotechnology. 2nd Edition, 351. Vol. 8b, D. Kelly (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-52728324-2.

U. T.Bornscheuer and R. J. Kazlauskas (1999). *Hydroases in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, ISBN 3-527-30104-6.

A. Bunch (1999) *Nitriles* in Biotechnology. 2nd Edition, 277. Vol. 8a, D. Kelly (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-30104-6.

R. Kazlauskas, U. Bornscheuer (1999) *Biotransformations with Lipases* in Biotechnology. 2nd Edition, 37. Vol. Sao, D.Kelly (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-30104-6

D. Witiak and A. Hopper (1996) *Chiral Pharmaceuticals* in Kirk-Otthmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 511. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52687-8

A. Zaks (1994) *Enzymes in Organic Synthesis*in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 9, 672 Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52677-0

Analytical enzymes **الأنزيمات التحليلية**

A. Usmani (1995). *Medical Diagnostic Reagents*inKirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 168S. Interscience-Wiley, ISBN 0-47152685-1

G. Kresse (1995).*Analytical* Use *ofEnzymes* inBiotechnology 2nd Edition, 137. Vol. 9, G. Reed, T. Nagodawithana (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28319-6.

E. Kopetzld, K. Lehnert, P. Buckel (1994). «Enzymes in diagnostics: achievementsand possibilities of recombinant DNAS technology.» *Clinical Chemistry*: vol. 40, p. 688.

Enzymes tests **الاختبارات الانزيمية**

P. Gherson, H. Lanza, M.Elavin, D. Vlastelica (1992). *Automated Instrumenation, Clincal Chemistry* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 3, 751. Interscience-Wiley, ISBN 0S471-52671-1.

Enzymes as additives **الأنزيمات كإضافات**

O. Kirk, T. V. Borchert, C. C. Fuglsang (2002). «Industrial enzyme applications.» *Current Opinion in Biotechnology:* vol. 13, p. 345.

W. Aehle and O.Misset (1999) *Enzymes for Industrial Applications* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition189. Vol. 5a, U. Ney, D. Schomburg (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28315-3.

H. Uhlig (1998).*Industrial Enzymes and their Applications*. John Wiley and Sons, ISBN 0-471-19660-6.

H. Olsen (1995).*Use of Enzymes in Food Processing* in Biotechnology 2nd Edition,663. vol. 9, G. Reed, T. Nagodawithana (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28319-6.

P. Nielsen, H. Malmos, T. Damhus, B. Diderichsen, H. Nielsen, M. Simonsen, H. Schiff, A. Oestergaard, H. Olsen, P. Eigtved, T. Nielsen, J. Xing (1994) *Industrial Enzyme Applications* in Kirk-OthmerEncyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 9, 567. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52677-0.

Detergent enzymes **أنزيمات المنظفات**

R. Gupta, Q. K. Beg, P. Lorenz (2002) «Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications.» *Applied Microbiology and Biotechnology*: vol. 59, 15 0-8247-9995-X.

J. Hv Ee, O.Misset, E. J. Baas (1997).*Enzymes in Detergency* in Surfactant Science Series *Vol.* 69, M. J. Schick, F. M. Fowkes (ed.). Marcel Dekker, Inc., ISBN 0-8247 9995-X.

J. Lynn (1993). D*etergency* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 7, 1072. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52675-4.

G. Jakobi, A. Löhr, M. Schwuger, D.Jung, W. Fischer, P. Gerike, K Künstler (1987) De*tergents* in Ullmann's Encyclopedia ofIndustrial Chemistry 5th edition A8,315. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20108-4.

Enzymes for starch hydrolysis **أنزيمات التحليل المائي للنشا**

C. Bertoldo and G. Antranikian (2002). «Starch hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria.» *Current Opinion in Chemical Biology*: vol. 6, p. 151

R. Whistler andJ. Daniel (1997) *Starch* in Kirk Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 22, 699. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52691-6

R. Daniel, R. Whistler, A. Voragen, W. Pilnik (1994). *Starch and Other Polysaccharides* inUllmann's Encyclopedia of IndustrialChemistry. 5th edition A25, 1. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20125-4

Enzymes and sweeteners **الأنزيمات والمحليات**

M. M. Silveira and R. Jonas (2002). «The biotechnological production of sorbitol.» *Applied Microbiology and Biotechnology*: vol. 59, p. 400.

R. Hebeda (1997).*Syrups* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 23, 582. Interscience- Wiley, ISBN 0-471-52692-4.

T. Lee (1997).*Sweeteners* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology4th Edition 23, 556. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52692-4

R. Hebeda (1995) *Carbohydrate-Based* Swee*teners* in Biotechnology 2nd Edition, 737. Vol. 9, G. Reed, T. Nagodawithana(ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28319-6

G-W.R. Lipinski (1995) *Sweeteners* inUllmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition A26, 23. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20126-2.

H. Schiweck, M. Clarke (1994) *Sugar* in Ullmann's Encyclopedia of IndustrialChemistry 5th edition A25, 345. Wiley - VCH, ISBN 3-527-20125-4.

F. Schenck (1989) *Glucose-Containing Syrups*in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition A12, 457 Wiley-VCH, ISBN 3-527-20112-2.

Enzymes for the hydrolysis of cellulose and polyoses **أنزيمات لتحليل السيلولوز وعديدات السكر**

N. Thompson (1995) *Hemicellulose* in Kirk-Othmer Encyclopedia of ChemicalTechnology 4th Edition 13, 54. Inter-science-Wiley, ISBN 0-471-52682-7.

H. Krässig, J. Schurz,R. Steadman, K. Schliefer, W. Albrecht (1986) *Cellulose* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition A5, 375. WileyVCH, ISBN 3-527-20105-X.

Enzymes in pulp and paper processing **أنزيمات معالجة عجينة الورق**

L.Viikari, M. Tenkanen, A Suumäkki (2001). *Biotechnology in the Pulp and PaperIndustry* in Biotechnology 2nd Edition,523. Vol. 10, H. Rehm (ed.). VCH-Wiley ISBN3-527-28320-X

A. Gutierrez, J. C. del Rio, M. J.Martinez and A.T. Martinez (2001), «The biotechnologicalcontrol of pitch in paper pulp manufacturing.» *Trends in Biotechnology:* vol. 19, p. 340.

M. Schulein (2000), «Protein engineering of cellulases.» *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1543,p. 239.

A. Breen, F. L. Singleton (1999). «Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 10, p. 252.

J. F. Dean, P. R. LaFayette, K. E. Eriksson, S. A. Merkle (1997), «Forest tree biotechnology.» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 57, p. 1.

A.Suumakki, M. Tenkanen, J. Buchert, L. Viikari (1997), «Hemicellulases in the bleaching of chemical pulps.» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 57, p. 261.

J. Genco (1996).*Pulp* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 20, 493. Interscience.Wiley, ISBN 0-471-52689-4.

M. Lyne (1996).*Paper* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 18, 1. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52687-8.

Pectinases **أنزيمات البكتيناز**

D. R. Kashyap, P. K. Vohra, S. Chopra, R.Tewari (2001). «Applications of pectinases in the commercial sector: a review.» *Bioresource Technology*: vol. 77 p. 215.

J. Baird (1994) *Gums* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 12, 842. Intersdence-Wiley, ISBN 0-471-52681-9.

Enzymes and milk products **الأنزيمات ومنتجات الحليب**

C. Hall (1995) *Milk and Milk Products* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 16, 700. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52685-1.

B. A. Law and F. Mulholland (1991). «The influence of biotechnological developments on cheese manufacture.» *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, vol. 9, p. 369.

J. Stein, K. Imhof (1990). *Milk and Dairy Products* in Ullmann's Encyclopedia of Industlial Chemistry 5th edition A16, 589. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20116-5.

Enzymes in baking and meet processing **أنزيمات صناعة الخبز وتحضير اللحوم**

B. Belderok (2000) «Developments in bread-making processes Plant Foods.» *Human Nutrition*: vol. 55, p. 1.

G. Spicher and J. Brummer (1995) *Baked Goods* in Biotechnology 2nd Edition, 241. Vol. 9, G. Reed, T. Nagodawithana (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28319-6.

G. Spicher and Y. Pomeranz (1985) *Bread and Other Baked Products* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition *A4*, 331. Wiley-VCR, ISBN 3527-20104-1.

Enzymes in leather and textile treatment **أنزيمات معالجة الجلود والأنسجة**

P. Hamlyn (1995), «The Impact of Biotechnology on the Textile Industry.» *Textiles Magazine*, vol. 3, p. 6.

E. Heideman (1990) *Leather* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition A15, 259. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20115-7.

Procedure for obtaining novel technical enzymes **إجراءات الحصول على أنزيمات تقنية جديدة**

J. Beilen and Z.Li (2002), «Enzyme technology: an overview.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 13, p. 338.

E. T. Farinas, T. Bulter, F. H. Arnold (2001), «Directed enzyme evolution.» *Current Opinion in Biotechnology*,vol. 12, p. 545.

K. A.Powell, S. W.Ramer, S. B. Del Cardayre [et al.] (2001). «Directed Evolution and Biocatalysis.» *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 40,p.3948.

M. T. Reetz (2001). «Combinatorial and Evolution-Based Methods in the Creation of Enantioselective Catalysts.» *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 40, p. 284.

F. H. Arnold and J. C Moore (1997), «Optimizing industrial enzymes by directed evolution.» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 58, p. 1.

Baker's yeast and fooder yeasts **خميرة الخباز والخمائر العلفية**

C. Caron (1995) *Commerdal Production of Baker's Yeast and Wine Yeast* in Biotechnology 2nd Edition. 321. Vol. 9. G. Reed and T. Nagodawithana (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28319-6.

Single cell protein, single cell oil **بروتين وزيت الخلايا المنفردة**

C. Ratledge (1997) *Microbial Lipids* in Biotechnology 2nd Edition. 133. Vol. 7, Hv. Döhren and H. Kleinkauf (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28310-2.

N. Scrimshaw and E. Murray (1995) *Nutritional Value and Safety of «Single Cell Protein»* in Biotechnology 2nd Edition, 221. Vol. 9, G. Reed, T. Nagodawithana (ed.). VCHWiley. ISBN 3-527-28319-6

J. Litchfield (1994). *Nonconventional Foods* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 11, 871. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52680-0

W. Babel, H-D Pöhland and K. Soyez (1993) *Single Cell Proteins* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition A24. 165. Wiley-VCH, ISBN 3-527. 20124-6

Biotechnology and environmental processes **التقانة الحيوية والعمليات البيئية**

S. Kjelleberg (2002). «Environmental biotechnology.»*Current Opinion in Biotechnology*, vol. 13, 199.

K. Riedel, G. Kunze and A. Konig (2002). «Microbial sensors on a respiratory basis forwastewater monitoring.» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 75, p. 81.

P. Nisipeanu (1999) *Laws, Statutory Orders and Directives on Waste and Wastewater Treatment* in Biotechnology 2nd Edition, 141. Vol. 11a, J. Winter (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28321-8.

Aerobic waste water treatment **المعالجة الهوائية لمياه الفضلات**

C. Gallert and J. Winter (2000).*Perspectives of Waste, Wastewater, Off-Gas, and Drinking Water Management* in Biotechnology 2nd Edition, 479. Vol. 11c, J. Winter (ed.). VCR-WHey, ISBN 3-527-28336-6.

W. Fritsche and M.Hofrichter (2000).*Aerobic Degradation by Microorganisms* in Biotechnology 2nd Edition, 145. Vol. 11 b, J. Klein (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-52728323-4.

L.Hartmann (1999).*Historical Development of Wastewater Treatment Processes* in Biotechnology 2nd Edition, 5. Vol. 11a, J Winter (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-52728321-8.

C. Gallert and J. Winter (1999) *Bacterial Metabolism* in *Wastewater Treatment* in Biotechnology 2nd Edition, 17. Vol. 11 a, J. Winter(ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-283218

R.Kayser (1999) *Activated Sludge Process* in Biotechnology 2nd Edition, 253. Vol. 11 a, J. Winter (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3527-28321-8.

P. Baumann and B Dorias (1999) *Trickling Filter Systems* in Biotechnology 2nd Edition, 335. Vol. 11 a, J. Winter (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-527-28321-8.

P. Koppe, A. Stozek, V. Neitzel (1999). *Municipal Wastewater and Sewage Sludge* in Biotechnology 2nd Edition, 161. Vol. 11 a, J. Winter (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3527-28321-8.

K. Rosenwinkel, U.Austermaml-Haun and R. Meyer (1999) *Industrial Wastewater Sources and Treatment Strategies* in Biotechnology 2nd Edition, 191. Vol. 11 a, J. Winter (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-52728321-8.

P.Weiland (1999). *Agricultural Waste and Wastewater Sources and Management* in Biotechnology. 2nd Edition, 217. Vol. 11 a, J. Winter (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3527-28321-8.

H. Kroiss and K. Svardal(1999). *CSTR-Reactors and Contact Processes* in *Industrial Waste water Treatment* in Biotechnology 2nd Edition, 479. Vol. 11a, J. Winter (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28321-8.

H. Jordening, K Buchholz (1999). *Fixed Film Stationary Bed and Fluidized Bed Reactors* in Biotechnology 2nd Edition, 493. Vol. 11 a, J. Winter (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28321-8

A. Schramm and R. Amann (1999).*Nucleic Acid-Based Techniques for Analyzing the Diversity, Structure, and Dynamics of Microbial Communities* in *Wastewater Treatment* in Biotechnology 2nd Edition, 85. Vol. 11 a, J. Winter (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3527-28321-8.

G. Andrews (1993) *Aerobic Waste Water Process Models* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 407. Vol. 4, K. Schügerl (ed.). VCR Verlagsgesellschaft, ISBN ISBN 3-527-28314-5.

Anaerobic waste water and sludge treatment **المعالجة اللاهوائية لمياه الفضلات والرسابة (الحمأة)**

C. Gallelt and J. Winter (2002). «Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology.» *Naturwissenschaften*, vol. 89, p. 483.

Y. Sekiguchi, Y.Kamagata and H. Harada (2001), «Recent advances in methane fermentation technology.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 12, p. 277.

B. Schink(2000).*Principles of Anaerobic Degradation of-Organic Compounds* in Biotechnology 2nd Edition, 169. vol. 11 b, J.Klein (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-52728323-4.

M.McInerney (1999).*Anaerobic Metabolism and* its *Regulation* in Biotechnology 2nd Edition, 455. Vol. 11a, J. Winter (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-527-28321-8.

S. Phythian (1999) *Esterases* in Biotechnology 2nd Edition, 193. Vol. 8a, D. Kelly (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-527-30104-6.

H.Märkl (1999). *Modeling of Biogas Reactors* in Biotechnology 2nd Edition, 527. Vol. 11 a, J.Winter (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3527-28321-8

D. Schürbüscher and C. Wandrey (1993) *Anaerobic Waste Water Process Models* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 441. Vol. 4, K Schügerl (ed.). VCR Verlagsgesellschaft, ISBN 3527-28314-5.

Biological treatment of exhaust air **المعالجة البيولوجية لهواء العادم**

K. Engesser and T. Plaggemeier (2000). *Microbiological Aspects ofBiological Waste Gas Purification* in Biotechnology 2nd Edition, 275. Vol. 11c, J. Winter (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3,527-28336-6.

K. Fischer (2000). *Biofilters* in Biotechnology 2nd Edition, 321. Vol. 11c, J. Winter (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-527-28336-6.

D. Chitwood and J. Devinny (2000).*Commerdal Applications ofBiological Waste Gas Purification* in Biotechnology 2nd Edition, 357. Vol. 11c, J. Winter (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-527-28336-6.

T. Plaggemeier and Ö. Lämmerzahl (2000). *Treatment of Waste Gas Pollutants in Trickling Filters* in Biotechnology 2nd Edition, 333. Vol. 11c, J. Winter (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-527-28336-6.

M. Reiser (2000).*Waste Gas Treatment: Membrane Processes and Alternative Techniques* in Biotechnology 2nd Edition, 345. Vol. 11c, J. Winter (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3527-28336-6.

E. Schippert and R. Chmiel (2000) *Bioscrubbers* in Biotechnology 2nd Edition, 305. Vol. 11c, J. Winter (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3527-28336-6.

M. Waweru, V. Rerrygers, H. V. Langenhove and W. Verstraete (2000). *Process Engineering ofBiological Waste Gas Purification* in Biotechnology 2nd Edition, 259. Vol. 11c, J. Winter (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-52728336-6.

Biological soil treatment **المعالجة البيولوجية للتربة**

J. Widada. R. Nojiri and T. Omori (2002). «Recent developments in molecular techniques for identification and monitoring of xenobiotic-degrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation.» *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 60, p. 45.

W.Ullrici (2000).*Contaminated Soil Areas, Different Countries and Contaminants, Monitoring of Contaminants* in Biotechnology 2nd Edition, 5. Vol. 11b, J. Klein (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-527-28323-4.

J. Klein (2000).*Possibilities, Limits, and Future Developments of Soi1 Bioremediation* in Biotechnology 2nd Edition, 465. Vol. 11b, J. Klein (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-52728323-4.

M. Koning, K. Rupe and R. Stegmann (2000). *Thermal Processes, Scrubbing/Extraction,Bioremediation and Disposal* in Biotechnology 2nd Edition, 305. Vol. 11b, J. Klein (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-52728323-4.

T.Held and R. Dörr (2000). *In situ Remediation* in Biotechnology 2nd Edition, 349. Vol.11b, J. Klein (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3527-28323-4.

R. Unterman, M. DeFlaun and R. J. Steffan (2000). *Acvanced in situ Bioremediation -A Hierarchy of Technology Choices* in Biotechnology 2nd Edition, 399. Vol. 11b, J Klein (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-527-28323-4

C. Wischnak and R. Müller (2000).*Degradation of Chlorinated Compounds* in Biotechnology 2nd Edition, 241. vol. 11b, J. Klein (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-527-28323-4.

V. Schulz-Berendt (2000).*Bioremediation with Heap Technique* in Biotechnology 2nd Edition, 319. Vol. 11b, J. Klein (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-527-28323-4.

K. Blotevogel and T. Gorontzy (2000).*Microbial Degradation of Compounds with Nitro Functions* in Biotechnology 2nd Edition,273. Vol. 11b, J. Klein (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-527-28323-4.

M. Kästner (2000).*»Humification» Process or Formation ofRefractory Soil Organic Matter* in Biotechnology 2nd Edition, 89. Vol. 11b, J Klein (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3527-28323-4.

F-M Menn, J. Easter and G. Sayleri (2000). *Genetically Engineered Microorganisms and Bioremediation* in Biotechnology 2nd Edition, 5. Vol. 11b, J. Klein (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-527-28323-4.

W. Chen, F. Bruhlmann, R. D. Richins and A Mulchandani (1999).»Engineering of improved microbes and enzymes for bioremediation.» *Current Opinion in Biotechnology*: vol. 10, p. 137.

R. Prince (1998) *Bioremediation* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition Supplement, 48. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52696-7.

M. Dua, A. Singh, N. Sethunathan, A. K. Johri (2002), «Biotechnology and bioremediation: successes and limitations.»*Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 59, p. 143.

Microbial leaching, biofilms, and biocorrosion — الارتشاح الميكروي، والأغشية الحيوية، والتأكل الحيوي (الحت)

R. C. Hemming (2002). «Biofouling in water systems -cases, causes and counter Measures.» *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 59, p. 629.

H. Brandl (2001).*Microbial Leaching ofMetals* in Biotechnology 2nd Edition, 191. Vol. 10, H. Rehm (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3527-28320-X.

G. Gadd (2001).*Accumulation and Transformation of Metals by Microorganisms* in Biotechnology. 2nd Edition, 225. vol. 10, H. Rehm (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-52728320-X.

W. Sand (2001). *Microbial Corrosion and its Inhibition* in Biotechnology 2nd Edition, 265. Vol. 10, H. Rehm (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28320-X.

H. Ehrlich (1997). «Microbes and metals.» *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 48, p. 687.

Medical biotechnology — التقانة الحيوية الطبية

P. Buckel (1998). «Toward a new naturalmedicine.» *Naturwissenschaften*: vol. 8, p. 155.

P. Buckel (1996). «Recombinant proteins for therapy.» *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 17, p. 450.

Insulin **الإنسولين**

S. Shoelson (1995).*Insulin and Other Antidiabetic Agents* in Kirk-Othmer ncyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 14, 662.Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52683-5

A. F. Bristow (1993).»Recombinant-DNA-derived insulin analogues as potentially useful therapeutic agents.»*Trends in Biotechnology*, vol. 11, p. 301.

F. Schmidt (1985) *Antidiabetic Drugs* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition A3, 1. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20103-3.

B. H. Frank and R. E. Chance (1983). «Two routes for producing human Insulin utilizing recombmant DNA technology.» *Muench.med. Wschr.*, vol. 125, p. 14.

Growth hormone and other hormones **هرمون النمو وبقية الهرمونات**

C. Hew and G. Fletcher (1997), «Transgenic fish for aquaculture.» *Chemistry* and *Industry*, p. 311.

G. Becker, W. MacKellar, R Riggin and V. Wroblewski (1995) *Hormones, Human Growth Hormone* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 13, 406. Interscience-Wiley, ISBN 0471-52682-7.

W. Engeland (1995) *Hormones, Survey* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 13, 357. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52682-7.

J. Sandow, E. Scheiffele, M. Haring, G. Neef, K.Prezewowsky and U. Stache (1989). *Hormones* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition A13, 89. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20113-0.

Hemoglobin, serum albumen, and lactoferrin **الهيموغلوبين، والبومين المصل واللاكتوفيرين**

T. M. Chang (1999), «Future prospects for artificial blood.» *Trends in Biotechnology*, vol. 17, p. 61.

W. Bell (1992).*Blood, Coagulants and Anticoagulants* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 4,333. Interscience-Wiley, ISBN 0-47152672-X.

S. Yamashita (1985) *Blood* in Ullimann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5thedition A4, 201. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20104-1.

Blood clothing agents **عوامل تخثر (تجلط) الدم**

R. Jiang, T. Monroe, R. McRogers, P. J. Larson (2002). «Manufacturing challenges in the commercial production of recombinant coagulation factor VIII.» Haemophilia, vol. 8 Suppl.1.

S. Soukharev, D. Hammond, N. M. Ananyeva, J. A. Anderson, C. A. Hauser, S. Pipe, E. L. Saenko (2002). «Expression of factor VIII in recombinant and transgenic systems Blood Cells.» *Mol Dis*. Vol. 28, p. 234.

E. G. D. Tuddenheim (1997). *Haemophilia: Molecular biology at the centre of human disease* in Molecular Biology in Medicine, 1. TM Cox, J. Sinclair (ed.). Blackwell Science Ltd., ISBN 0-632-02785-1.

Anticoagulants and thrombolytic agents **مضادات التخثر (التجلط) والعوامل الحالة للخثرة**

F. Markwardt (2002), «Hirudin as alternative anticoagulant-a historical review.» *Semin Thromb Hemost*, vol. 28, p. 405.

B. H. Bendixen and L. Ocava (2002). «Evaluation and management of acute ischemic stroke.» *Current Cardiology Reports*, vol. 4, p. 149.

W. Bode and H. Renatur (1997) «Tissue-type plasminogen activator: variants and crystal/solution structures demarcate structural determinants of function.» *Current Opinion in Structural Biology*, vol.6, p. 865.

H. Jayaram, G. Ahluwalia and D. Cooney (1994).*Therapeutic Enzyme Applications* in Kirk-Othnner Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 9, 621. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52677-0.

Enzyme inhibitors **مثبطات الانزيمات**

A. Muscate, C. Levinson and G. Kenyon (1994). *Enzyme Inhibitors* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 9, 646 Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52677-0.

The Immune system **الجهاز المناعي**

B. Corthesy (2002). «Recombinant immunoglobulin A: powerful tools for fundamental and applied research.»*Trends in Biotechnology*, vol. 20, p. 65.

C. Janeway and P Travers (1997). *Immunobiology*. 3rd Edition. Current Biology, 0443-05964-0.

Stem cells **الخلايا الجذعية**

G. Daley (2002), «Prospects for stem cell therapeutics: myths and medicines.» *Current Opinion in Genetics and Development*, vol. 12, p. 607.

M. Lanu (2001). «Adult stem cells: an alternative to embryonic stem cells?.» *Trends in Biotechnology*, vol. 19, p. 487.

AColman and A. Kind (2000). «Therapeutic cloning: concepts and practicalities.» *Trends in Biotechnology*, vol. 18, p. 192.

J. A. Thomson and J. S. Odorico (2000). «Human embryonic stem cell and embryonic genu cell lines.» *Trends in Biotechnology*, vol. 18 p. 53.

Tissue engineering **هندسة الأنسجة**

M. V. Risbud and M Sittinger (2002). «Tissue engineering: advances in in vitro cartilage generation.» *Trends in Biotechnology*, vol. 20, p. 351.

L. G. Griffith and G. Naughton (2002). «Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities.» *Science*, vol. 295, p.1009.

P. Bianco and P. G. Robey (2001). «Stem cells in tissue engineering.» *Nature*, vol.414, p. 118.

Interferons **الإنترفيرونات**

G. Wetzel (1999) *Medical Applications of Recombinant, Proteins in Humans and Animals* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 125. Vol. 5a, U. Ney, D. Schomburg (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28315-3.

S. Wong and J. Xing (1995) *Immunotherapeutic Agents* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 14,64. Interscience-Wiley. ISBN 0-471: 52683-5

T. Nagabhushan and P Trotta (1989). *Inteiferons* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistly 5th edition A14, 365. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20114-9.

Interleukins **الإنترلوكينات**

K. Friehs andK. F Reardon (1993). «Parameters influencing the productivity of recombinant E. coli cultivations.» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 48, p. 53.

A. S. Lubiniecki and J. H. Lupker (1994). «Purified protein products of rDNA technology expressed in animal cell culture.» *Biologicals*, vol. 22, p. 161.

Other therapeutic proteins **بروتينات علاجية أخرى**

R. Schiffmann and R. O. Brady (2002). «New prospects for the treatment of lysosomal storage diseases.» Drugs, vol. 62, p. 733.

C. E. Kearney and C. E. Wallis (2000). «Deoxyribonuclease for cystic fibrosis Cochrane Database-Syst Rev. CD001127.

Vaccines **اللقاحات**

C. Hsieh and M. Ritchey (1997). *Vaccine Technology* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 24. 727. Interscience-Wiley, ISBN 0-47152693-2.

S. Cryz, M. Granstrom, B. Gottstein, L Perrin, A. Cross, J. Larrick (1989). *Immunothetpay and Vaccines* in Ulhnann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition A14, 49. Wiley VCH, ISBN 3527-20114-9.

Recombinant vaccines **اللقحات المأشوبة**

F. X. Berthet, T. Coche and C. Vinals (2001), «Applied genome research in the field of human vaccines.» *Journal of Biotechnology*, vol. 85, p. 213.

C. Olive, I. Toth and D. Jackson (2001). «Technological advances in antigen delivery and synthetic peptide vaccine developmental strategies.» *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, vol. 1, p. 429

A. M. Walmsley and C. J.Arntzen (2000), «Plants for delivery of edible vaccines.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 11, p. 126.

Antibodies **الأجسام المضادة**

K. Rajewsky (1996). «Clonal selection and learning in the antibody system.» *Nature*, vol. 381, p. 751.

C. A.Janeway, Jr. (1993). «How the immune system recognizes invaders.» *Scientific American*, vol.269, p. 72.

Monoclonal antibodies **الأجسام المضادة وحيدة النسيلة**

G. Galfre, D. Secher and P. Crawley (1990).*Monoclonal Antibodies* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition A16, 699. Wiley-VCH, ISBN 3527-20116-5

Recombinant and catalytic antibodies **الأجسام المضادة المأشوبة والتحفيزية**

K. D.Wittrup (2001). «Protein engineering by cell-surface display.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 12, p.395.

H. E. Chadd and S. M. Chamow (2001), «Therapeutic antibody expression technology.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 12, p. 188.

G. Blackburn and A. Garcon (2000) *Catalytic Antibodies* in Biotechnology 2nd Edition, 491. Vol. 8b, D. Kelly (ed.). VCH Wiley, ISBN 3-527-28324-2.

J. Adair (1999) *Antibody Engineeringand Expression* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 219. Vol. 5a, U. Ney and D. Schomburg (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-2-315-3.

A. Racher, J. Tong andJ Bonnerjea (1999). *Manufacture of Therapeutic Antibodies* in Biotechnology Second. Completely Revised Edition, 247. Vol. 5a, U. Ney, D. Schomburg (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28315-3

E. Driggers and P. G. Schultz (1996). «Catalytic Antibodies.» *Advances in Protein Chemistry*, vol.49, p. 261.

Immunoanalysis **التحليل المناعي**

J. Miller and R. Niessner (1994) *Enzyme and Immunoassays* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition B5, 129. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20135-1.

Biosensors **المستشعرات الحيوية**

F. W. Scheller, U. Wollenberger, A. Warsinke and F. Lisdat (2001), «Research and development in biosensors.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 12, p. 35.

R. L. Rich and D. G. Myszka (2000), «Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis,» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 11, p. 54.

K. Cammann, B. Ross, W. Hasse, C. Dumschat, A. Katerkamp, J.Reinbold, G Steinhage, B. Griindig, R. Renneberg and N. Buschmann (1994) *Chemical and Biochemical Sensors* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition B6, 121. Wiley-VCH, ISBN 3-S2720136-X.

B. Mattiasson (1993). *Biosensors* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 5. Vol. 4, K Schügerl (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-52728314-S

W. Pietro (1992) *Biosensors* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 4, 208. Interscience-Wiley, ISBN 0471-52672-X.

Animal breeding **تربية وتأهيل الحيوانات**

G. Bulfield (2000), «Farm animal biotechnology.» *Trends in Biotechnology*, vol. 18,p. 10.

Embryo transfer, cloned animals **نقل الأجنة والحيوانات المكلونة (المستنسخة)**

E. Wolf, V. Zakhartchenko and G. Brem (1998), «Nuclear transfer in mammals: recent developments and future perspectives.» *Journal of Biotechnology*, vol. 65, p. 99.

Gene maps **الخرائط الجينية**

G. H. Yue, P. Beeckmann, H Bartenschlagel, G. Moser and H. Geldermann (1999), Rapid ad precise genotyping ofporcine microsatellites.» *Electrophoresis*, vol. 20, p. 3358.

M. Lucy and R. Collier (1994) *Genetic Engineering, Animals* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical. Technology 4th Edition 12, 465 Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52681-9.

G. Wricke, H. Geldermann and W. Weber, (1993) *Gene Mapping in Animals and Plants* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 141. vol. 2. A Pühler (ed.).VCH Verlagsgesellschaft. ISBN 3-527-28312-9.

H. Geldermann (1990) *Application of Genome Analysis in Animal Breeding* in Genome Analysis in Domestic Animals Vol. H Geldermann. F Ellendorf (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-S27-28097-9.

Transgenic animals **الحيوانات المحورة وراثياً**

A. Trounson (2001). «Nuclear transfer in Imman medicine and animal breeding.» *Reproduction, Fertility and Development*, vol. 13, p. 31.

D. Metzger and R. Feil (1999), «Engineeling the mouse genome by site-specific recombination.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 10, p. 470.

G. Brem (1993) *Transgenic Animal*in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 745. Vol. 2. A. Pühler (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3527-28312-9,

Gene farming and xenotransplantation **زراعة الجينات والزرع الغريب**

L. Brasile, B. M. Stubenitsky, G. Kootstra (2002). «Solving the organ shortage: potential strategies and the likelihood of success.» *ASAIO Journal*, vol. 248, p. 211.

J. W.Larrick and D. W. Thomas (2001). Producing proteins in transgenic plants and animals.» *Current Opinion in Biotechnology*,vol. 12, p. 411.

A. Dove (2000), «Milking the genome for profit.» *Nature Biotechnology*, vol.18, p. 1045.

N. S. Rudolph (1999), «Biopharmaceutical production in transgenic livestock.» *Trends in Biotechnology*, vol. 17, p. 367.

Plant breeding **تربية وتأصيل النبات**

J. Huang, C. Pray and S. Rozelle (2002). «Enhancing the crops to feed the poor.» *Nature*, vol. 418, p. 678.

R. P. Tengerdy and G. Szakacs (1998). «Perspectives in agrobiotechnology.» *Journal of Biotechnology*, vol. 66, p. 91.

Plant tissue surface culture — مزارع أنسجة النبات السطحية

B. W. Grout (1999). «Meristem-tip culture for propagation and virus elimination.» *Methods in Molecular Biology*, vol. 111, p. 115.

Plant cell suspension culture — مزارع خلايا النبات المعلقة

S. Jennewein and R. Croteau (2001). «Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications.» *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 57, p. 13.

J. Berlin (1997).*Secondary Products from Plant Cell Cultures* in Biotechnology 2nd Edition, 593. Vol. 7, Hv. Dohren, H. Kleinkauf (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-52728310-2.

S. C Roberts and M. L. Shuler (1997). «Large-scale plant cell culture.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 8, p. 154.

P. M. Kieran, P. F. MacLoughlin and D. M. Malone (1997), «Plant cell suspension cultures: some engineering considerations.» *Journal of Biotechnology*, vol. 59, p. 39.

M. Petersen and A. W. Alfermann (1993) *Plant Cell Cultures* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 577. Vol. 1, H. Sahm (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28337-4.

A. Tanaka (1987). «Large-scale cultivation of plant cells at high density: a review.» *Process Biochemistry*, p.106

Transgenic plants: methods — النباتات المحورة وراثياً: الطرائق

A. Vanavichit, S. Tragoonrung and T. Toojinda (2001) *Genomic Mapping and Positional Cloning with Emphasis on Plant Science* in Biotechnology 2nd Edition, 165. Vol. 5b, C. Sensen (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3527-28328-5.

M. Hughes (1996).*Plant Molecular Genetics*.Longman. ISBN 0-582-24730-6.

J. Edwards, G. Kishore and D. Stark (1994).*Genetic Engineering, Plants* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 12, 491. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52681-9.

G. Kahl and K Weising (1993). *Genetic Engineering of Plant Cells* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 547. Vol. 2, A. Pühler (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28312-9

Transgenic plants: resistance — النباتات المحورة وراثياً: المقاومة

C. T. Verrips, M. M. Warmoeskerken and J. A. Post (2001), General introduction to the importance of genomics in food biotechnology and nutrition.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 12, p. 483.

I. Parkin, S. Robinson, A. Sharpe, K. Rozwadowski, D. Hegedus, D. Lydiate (2001). *Agri-Food and Genomics* in Biotechnology 2nd Edition, 145. Vol. 5b, C. Sensen (ed.). VCHWiley, ISBN 3-527-28328-5.

J. Mol, E. Cornish, J. Mason and R. Koes (1999), «Novel coloured flowers.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 10, p. 198.

Transgenic plants: products النباتات المحورة وراثياً: المنتجات

J. W.Larrick and D. W. Thomas (2001), «Producing proteins in transgenic plants and animals.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 12, p. 411.

G. Giddings (2001), «Transgenic plants as protein factories.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 12, p. 450.

S. A. Merkle and J. F. Dean (2000), «Forest tree biotechnology.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 11, p. 298.

Y. Poirier (1999), «Production ofnew polymeric compounds in plants.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 10, p. 181.

L. Willmitzer (1993). *Transgenic Plants* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 627. Vol. 2, A. Pühler (ed.). VCR Verlagsgesellschaft, ISBN 3527-28312-9.

Viruses الفيروسات

P. Ahlquist (2002). «RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing.» *Science*, vol. 296, p. 1270.

E.Baranowski, C. M. Ruiz-Jarabo and E. Domingo (2001), «Evolution of cell recognition by viruses,» *Science*, vol. 292, p. 1102.

J. L. Dangl and J. D.Jones (2001), «Plant pathogens and integrated defence responses to infection.» *Nature*, vol. 411, p. 826.

A. J. McMichael, S. L. Rowland-Jones (2001). «Cellular immune responses to HIV.» *Nature*, vol.410, p. 980.

R. M.Zinkernagel (1996), «Immunology taught by viruses.»*Science*, vol.271, p. 173.

bacteriophages العاثيات

H. Sandmeier and J. Meyer (1993) *Bacteriophages* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 543. Vol. 1, H. Sahm (ed.). VCH Verlagsgeseschaft, ISBN 3-527-28337-4

Microorganisms الكائنات المجهرية

C. Bertoldo, R. Grote and G. Antranikian (2001) *Biocatalysis under Extereme Conditions* in Biotechnology 2nd Edition, 61. Vol. 10, R. Rehm (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3527-28320-X.

Amann, B. M. Fuchs and S. Behrens (2001). «The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 12, p. 231.

H. J. Busse, E. B. Denner and W. Lubitz (1996), «Classification and identification ofbacteria: current approaches to an old problem: Overview of methods used in bacterial systematic.» *Journal of Biotechnology*, vol. 47, p. 3.

bacteria **البكتريا**

H. Bahl and P. Dürre (1993) *Methylotrophs* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 285. Vol. 1, H. Sahm (ed.).VCH Verlagsgesellschaft. ISBN 3-527 28337-4.

R König (1993). Methanogens in Biotechnology Second, «Completely Revised Edition. 251. Vol. 1, H. Sahm (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-52728337-4.

L. Dijkhuizen (1993).*Methylotraphs* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 265. Vol. 1, H. Sahm (ed.). VCR Verlagsgesellschaft, ISBN 3527-28337-4.

F. G. Priest (1993) *Bacillus* in Biotechnology Second Completely Revised Edition, 367. Vol. 1, R. Sahm (ed.). VCR Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28337-4

G. Auling (1993).*Pseudomonads* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 401 Vol. 1, H. Sahm (ed.). VCR Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-283374.

W. Piepersberg (1993).*Streptomycetes and Corynebacteria* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 433. Vol. 1, H. Sahm (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28337-4.

Some bacteria of importance for biotechnology **بعض البكتريا الهامة في التقانات الحيوية**

P. J. Punt, N. van Biezen and A. Conesa [et al.] (2002). «Filamentous fungi as cellfactories for heterologous protein production.» *Trends in Biotechnology*, vol. 20, p. 200.

J. R. Swartz (2001). «Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 12, p. 195.

F. Blattner, G. Plunkett, C. Bloch, N. Perna, V. Burland, M. Riley, J.Collado-Vides, J. Glasner, C. Rode, G. Mayhew, J. Gregor, N. Davis, H. Kirkpatrick, M. Goeden, D. Rose, B. Mau and Y. Shao (1997), «The Complete Genome Sequence ofEscherichia coli K-12.» *Science*, vol. 277, p. 1453.

Fungi **الفطريات**

F. Meinhardt and K. Esser (1993) *Filamentous Fungi* in Biotechnology Second. Completely Revised Edition, 515, Vol. 1, R. Sahm (ed.). VCR Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28337-4

Yeasts **الخمائر**

G. P. Cereghino and J. M. Cregg (1999). Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 10, p. 422.

D. Maloney (1998). *Yeasts* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4^{th} Edition 25, 761. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52694-0.

J. J. Heinisch and C. P. Hollenberg (1993). *Yeasts* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 469. vol. 1, H. Sahm (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-52728337-4.

Microorganisms: isolation, preservation, safety **الكائنات المجهرية: العزل، والحفظ والأمان**

K. Frobel and S. Metzger (2001) *New Methods of Screening in Biotechnology* in Biotechnology 2^{nd} Edition, 41. Vol. 10, H. Rehm (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28320-X.

Microorganisms: strain improvement الكائنات المجهرية: تحسين السلالات

A. Crueger (1993). *Mutagenesis* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 5. Vol. 2, A. Pühler (ed.). VCH Vedagsgesellschaft, ISBN 3-527-283129.

J. Engels, B. Sprunkel and E. Uhlmann (1993) *DNA Synthesis* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 317. Vol. 2, A. Pühler (ed.). VCH Vedagsgesellschaft, ISBN 3-527-28312-9.

L. Recio (1990) *Mutagenic Agents* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition A16, 755. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20116-5.

Growing microorganisms تنمية الكائنات المجهرية

E. Stoppok and K. Buchholz (1996). *Sugar-Based Raw Materials for Fermentation Applications* in Biotechnology 2nd Edition, 5. Vol. 6, M. Roehr (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28316-1.

J. D. Troostembergh (1996) *Starch-Based Raw Materials for Fermentation Applications* in Biotechnology 2nd Edition, 31. Vol. 6, M Roehr (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-52728316-1.

F. Schneider, H. S. Teinmiiller (1996) *Raw Material Strategies-Economical Problems* in Biotechnology 2nd Edition, 47. Vol. 6, M Roehr (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3527-28316

S. Sengha (1994). *Fermentation* in Kirk-Othmer Encyclopediaof Chemical Technology 4th Edition 10, 361. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52678-9

R. Greasham (1993). *Media for Microbial Fermentations* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 127. vol. 3, G. Stephanopoulos (ed.). VCH Vedgsgesellschaft, ISBN 3-527-28313-7.

Growth kinetics and product formation حركيات النمو وعمليات تشكيل المنتج

C. H Posten and C. L. Cooney (1993) *Growth ofMicroorganisms* in Biotechnology Second. Completely Revised Edition, 111. Vol. 1, H. Sahm (ed.). VCH Vedagsgesellschaft. ISBN 3-527-28337-4

Fed-batch and continuous fermentation التخمير بالدفعة المغذاة والتخمير المستمر

T. Imanaka (1993). *Strategies for Fermentation with Recombinant Organisms* in Biotechnology Second. Completely Revised Edition, 283. vol. 3, G. Stephanopoulos (ed.). VCH Vedagsgesellschaft, ISBN 3-527-28313-7.

T. Yamane and S. Shimizu (1984) «Fed-Batch Techniques in Microbial Processes.» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 30, p. 147.

Fermentation technology تقانة التخمير

K. H. Lee and V. Hatzimanikatis (2002). «Biochemical Engineering.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 13, p. 85.

R. Katzen and G. T. Tsao (2000). «A view of the history of biochemical engineering *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 70, p. 77.

K. Schugerl (2000), «Development of bioreaction engineering.» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 70, p. 41.

R. Kleijntjens and K. Luyben (2000) *Bioreactors* in Biotechnology 2nd Edition, 329. Vol. 11 b, J. Klein (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3527-28323-4.

G. Larsson, S. B. Jorgensen, M. N. Pons, B. Sonnleitner, A. Tijsterman and N Titchener-Hooker, (1997), «Biochemical engineering science.» *Journal of Biotechnology*, vol. 59, p. 3.

B. Tarmy (1996). *Reactor Technology* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 20,1006. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52689-4.

M. Reuss (1993). *Oxygen Transfer and Mixing: Scale-Up Implications* in Biotechnology Second. Completely Revised Edition, 185. Vol. 3, G Stephanopoulos (ed.) VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-52728313-7.

B. Buckland and M. Lilly (1993). *Fermentation an Overview* in Biotechnology. Second, Completely Revised Edition, 7. Vol. 3, G. Stephanopoulos (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28313-7.

J. Nielsen and J. Villadsen (1993) *Bioreactors: Description and Modelling* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition,77. Vol. 3, G. Stephanopoulos (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-52728313-7.

H. Voss (1992) *Bioreactors* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition B4, 381. Wiley-VCH, ISBN 3527-20134-3.

Fermentation technology: scale-up **تقانة التخمير : رفع مستوى الإنتاج**

B. Sonnleitner (2000), «Instrumentation of biotechnological processes.» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol.66, p.1.

G. Seidel, C. Tollnick, M. Beyer, K. Schugerl (2000), «On-line and off-line monitoring of the production of cephalosporin C by Acremonium chrysogenum.»*Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 66, p.115.

H. J. Henzler (2000), «Particle stress in bioreactors.» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 67, p.35.

D. A.Mitchell, M. Berovic and N. Krieger (2000), «Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing.» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 68, p. 61.

W. Beyeler, E. DaPra and K. Schneider (2000), «Automation of industrial bioprocesses.» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 70, p. 139.

T. Chattaway, G. Montague and A.Morris (1993). *Fermentation Monitoring and Control* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 319, vol. 3, G Stephanopoulos (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28313-7.

L. Erockson, D. Fung, P. Tuitemwong (1993) *Anaerobic Fermentations* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 7. vol. 3, G. Stephanopoulos (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-52728313-7.

Cultivation of mammaliam cells **زراعة خلايا الثدييات**

C. Bardouille (2001). *Maintenance* of *Cell Cultures -with Special Emphasis on Eukaryo*tic Cells in Biotechnology 2nd Edition, 27. Vol. 10, H. Rehm (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28320-X.

F. Hesse and R. Wagner (2000), «Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures.»*Trends in Biotechnology*, vol. 18, p.173.

H. Hauser and R. Wagner (1997),*Mammalian Cell Biotechnology* in *Protein Production*. Walter de Gruyter, 3-11-013403-9.

R. Wolfe (1993) *Mediafor Cell Culture* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 141. Vol. 3, G. Stephanopoulos (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527.28313-7.

M. Wirth and H. Hauser (1993) *Genetic Engineering* of *Animal Cells* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 663. Vol. 2, A Piihler (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28312-9

Mammalian cell's bioreactors **مفاعلات خلايا الثدييات الحيوية**

G. Kretzmer (2002), «Industrial processes with animal cells.»*Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 159, p. 135.

L. Chu and D. K. Robinson (2001), «Industrial choices for protein production by large-scale cell culture.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 12, 180.

W. S. Hu and J. G. Aunms (1997), «Large-scale mammalian cell culture.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 8, p. 148.

B. Kelley, T. Chiou, M. Rosellberg and D. Wang (1993) *Industrial Animal Cell Culture* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 23. Vol. 3, GStephanopoulos (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28313-7.

J. Aunins and H. Henzler (1993).*Oxygen Transfer in Cell Culture Bioreactors* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 219. Vol 3, G Stephanopoulos (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28313-7.

A. Sambanis and W. Hu (1993) *Cell Culture Bioreactors* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 105. Vol. 3, G. Stephanopoulos (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28313-7.

R. Bliem, K. Konopitzky and H. Katinger (1991), «Industrial animal cell reactor systems: aspects ofselection and evaluation.» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 44, p. 1

Enzyme and cell reactors **المفاعلات الأنزيمية والخلوية**

A. Bommarius (1993), *Biotransformations and Enzyme Reactors* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 7. Vol. 3, G. Stephanopoulos (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-283137.

S. Furusaki and M. Seld (1992), «Use and engineering aspects ofimmobilized cells in biotechnology.» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 46, p.161.

Recovery of bioproducts **استرجاع المنتجات الحيوية**

R. Rudolph, H. Lilie and E. Schwarz (1999) *In vitro Folding of Inclusion Body Proteins* on *an Industrial Scale* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 111. Vol. 5a, U. Ney, D.Schomburg (ed.)» VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-283153.

A. Mukhopadhyay (1997), «Inclusion bodies and purification of proteins in biologically active forms.» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 56, p. 61.

R.Spears (1993). *Overwiev of Downstream Processing* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 39, Vol. 3, G Stephanopoulos (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28313-7.

J.Shaeiwitz and J. Henry (1988) *Separation in Biotechnology; Biochemical Separations* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition B3, 11. WileyVCH, ISBN 3-527-20133-5.

Recovery of bioproducts : chromatography **استرجاع المنتجات الحيوية : الكروماتوغرافيا**

R. Burgessn and N. Thompson (2002), «Advances in gentle immunoaffinity chromatography.» Current Opinion in Biotechnology, vol. 13, p. 304.

S. Imamoglu (2002), «Simulated moving bed chromatography (SMB) for application in bioseparation.» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 76,p. 211.

F. Svec (2002), «Capillary electrochromatography: a rapidly emerging separation method.» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 76, p. 1.

J. A. Queiroz, C. T. Tomaz, J. M. Cabral (2001), «Hydrophobic interaction chromatography of proteins.» *Journal of Biotechnology*, vol. 87, p. 143.

D. King (1999) *Use ofAntibodies for Immunopurification* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 275. Vol. 5a, U. Ney, D. Schomburg (ed.), VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28315-3.

M. Ladisch (1998) *Bioseparations* in Kirk-Othmer Encyclopediaof Chemical Technology 4th Edition Supplement, 89Interscience-Wiley, ISBN 0-47152696-7

N. Labrou and Y. D. Clonis(1994), «The affinity technology in dowllstream processing.» *Journal of Biotechnology*, vol. 36, p. 95.

P. M. Boyer and J. T.Hsu (1993), «Protein purification by dye-ligand chromatography.» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 49, p. 1.

A. D. Diamond and J. T.Hsu (1992), «Aqueous two-phase systems for biomolecule separation.» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 47, p.89.

G. Jagschies (1988). *Separation in Biotechnology: Process-Scale Chromatography* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition B3, 10. WileyVCH, ISBN 3-527-20133-5.

DNA structure **الـ DNA : البنية**

J. Rehmann (1996). *Nucleic Adds* in kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 17, 507. Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52686-X

F. Götz (1993) *Structure and Function of DNA* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 191. Vol. 2, A Pühler (ed.). VCR Verlagsgesellschaft, ISBN 3527-28312-9

Genetic engineering: general steps **الهندسة الوراثية : الخطوات عامة**

F. Schmidt (1995), *Genetic Engineering, Procedures* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 12, 440. Interscience-Wiley, ISBN 0-47152681-9.

V. Nagarajan (1994), *Genetic Engineering, Microbes* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 12,481, Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52681-9.

B. Holloway (1993) *Genetic Exchange Processes for Prokaryotes* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 47. Vol. 2, A. Pühler (ed.). VCH VerlagsgeseUschaft, ISBN 3-527-28312-9.

U. Stahl and K. Esser (1993) *Genetic Exchange Processes in Lower Eukaryotes* in Biotechnology Second. Completely Revised Edition, 73. Vol. 2, A Pühler (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-283129.

PCR: general method **تفاعل البوليمراز التسلسلي : الطريقة العامة**

Y. L. Ong and A. Irvine (2002). «Quantitative realtime PCR: a critique of method and practical considerations.»*Hematology*, vol.7, p.59.

H. A. Erlich, D. Gelfand and J. J. Sninsky (1991), «Recent advances in the polymerase chain reaction.» *Science*, vol.252, p. 1643.

DNA sequencing **سلسلة الـ DNA**

L. Middendorf, P. Humphrery, N. Narayanan, S. Roemer (2001),*Sequencing Technology* in Biotechnology 2nd Edition 193. Vol. 5b, C. Sensen (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28328-5.

G. Volckaert, P. Verhasselt, M. Voet and J. Robben (1993),*DNA Sequencing* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 257. Vol. 2. A Pühler (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-52728312-9.

Transfer of foreign DNA in living cells (transformation) **نقل الـ DNA الغريب إلى الخلايا الحية**

H. Schwab (1993). *Principles of Genetic Engineering for Escherichia coli* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 373, Vol. 2, A Pühler (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-283129.

W. Wohlleben, G. Muth and J. Kalinowski (1993) *Genetic Engineering of Gram-Positive Bacteria* in Biotechnology Second. Completely Revised Edition, 455. vol. 2, A. Pühler (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28312-9.

U. Priefer (1993), *Principles of Genetic Engineering of Gram-negative Bacteria* in Biotechnology Second. Completely Revised Edition, 427. Vol. 2, A. Pühler (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3527-28312-9.

P. Sudbery (1993),*Genetic Engineering of Yeast* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 507. Vol. 2. A. Pühler (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28312-9.

G. Turner (1993), *Genetic Engineering of Filamentous Fungi* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition. 529, Vol. 2, A. Pühler(ed.). VCH Verlagsgesellschaft,ISBN 3-527-28312-9.

Gene expression — التعبير الوراثي

C. Gorman and C. Bullock (2000), «Site-specific gene targeting for gene expression in eukaryotes.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 11, p. 455.

F. Baneyx (1999), «Recombinant protein expression in Escherichia coli.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 10, p.411.

R. Mattes (1993), *Principles of Gene Expression* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 233. Vol. 2, A Pühler (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3527-28312-9.

Gene silencing — أسكات الجينات

S. W. Ding (2000), «RNA silencing.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 11,p.152.

RNA — الـ RNA

A. Fatica and D. Tollelvey (2002), «Making ribosomes.»*Current Opinion in Biotechnology*, vol.14, p. 313.

J. A. Doudna and T. R. Cech (2002), «The chemical repertoire ofnatural ribozymes.»*Nature*, vol. 418, p. 222.

G. F.Joyce (2002). «The antiquity of RNAbased evolution.» *Nature*, vol. 418, p. 214.

B. A. Sullenger and E. Gilboa (2002). «Emerging clinical applications of RNA.» *Nature*, vol. 418, p. 252.

G. J. Hannon (2002), «RNA interference.» *Nature*, vol. 418, p. 244.

T. Hermann and D. J. Patel (2000). «Adaptive recognition by nucleic acid aptamers.» *Science*, vol.287, p. 820.

M. Famulok, G. Mayer and M. Blind (2000), «Nucleic acid aptamers-from selection in vitro to applications in vivo.» *Accounts of Chemical Research*, vol. 33, p. 591

Gene libraries and gene mapping — المكتبات الجينية والخرائط الجينية

F. Sterky and J. Lundeberg (2000). «Sequence analysis of genes and genomes.» *Journal of Biotechnology*, vol. 76, p. 1.

Geneomes of prokaryotes and eukaryotes — الخرائط الجينية لأوليات النوى وحقيقياتها

A. Pühler, D.Jording, J. Kalinowski, D. Buttgereit, R. Renkawitz-Pohl, L. Altschmied, A. Danchin, H. Feldmann, H. KJeink and M. Kroger (2001),*Genome Projects of Model Organisms* in Biotechnology 2nd Edition, 5. Vol. 5b,C Sensen (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28328-5.

The human genome — الجينوم البشري

L. Tsui and S. Scherer (2001) *The Human Genome Project* in Biotechnology 2nd Edition, 41. Vol. 5b, C. Semen (ed.). VCR-Wiley, ISBN 3-527-28328-5.

Functional analysis of the human genome **التحليل الوظيفي للجينوم البشري**

R. Green (2001), *Genomics and Human Disease* in Biotechnology 2nd Edition, 105. Vol. 5b, C. Sensen (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28328-5.

G. Dellaire (2001), *Genetic Disease* in Biotechnology 2nd Edition, 61. Vol. 5b, C Sensen (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-52728328-5.

Mange, A. Mange (1994) *Basic Human Genetics*. Sinauer Associates, ISBN 0-87893495-2.

DNA assays **معايرات الـ DNA**

P. M. Hurley and C. H. Rodeck (1997), *Prenatal diagnosis* in Molecular Biologyin Medicine 299. T. M. Cox and J. Sinclair (ed.). Blackwell Science Ltd., ISBN 0-632-02785-1.

DNA and protein arrays **مصفوفات البروتين والـ DNA**

D. D. Shoemaker and P. S. Linsley (2002), «Recent developments in DNA mictoarrays.» *Current Opinion in Microbiology*, vol. 5, p. 334.

M. F. Templin, D. Stoll and M. Schrenk [et al.] (2002), «Protein microarray technology.» *Trends inBiotechnology*, vol. 20, p. 160.

H. Eickhoff, Z. Konthur and A. Lueking [et al.] (2002), «Protein array technology: the tool to bridge genomics and proteomics.» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 77, p. 103.

D. H. Blohm and A. Guiseppi-Elie (2001), «New developments in microarray technology.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 12, p. 41.

D. Tessier, D. Thomas and R. Brousseau (2001).*ADNA Microarrays Fabrication Strategy* in Biotechnology 2nd Edition, 227. Vol. 5b, C. Sensen (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3527-28328-5.

E. T. Fung, V. Thulasiraman, S. R. Weinberger and E. A. Dalmasso (2001), «Protein biochips for differential- profiling.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 12, 65.

N. L. van Hal, O. Vorst, A. M. van Houwelingen, E. J. Kok, A. Peijnenburg, A Aharoni, A. J. van Tunen, J. Keijer (2000). The application of DNA micro arrays in gene expression analysis.»-*Journal of Biotechnology*, vol. 78, p. 271.

M. Schena (2000), *Microarray Technology,* Eaton Publishing. ISBN 1-881299-37-6.

M. Hagmann (2000), «Doing Immunologyon a chip.» *Sciences*, vol. 290, p. 82.

A. Lueking, M Horn, and H. Eickhoff [et al.] (1999), «Protein microarrays for gene expression and antibody screening.» *Analytical Biochemistry*,vol. 270, p. 103.

Reporter groups **المجموعات المخبرة**

R. Rigler (1995), «Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening, Application in biotechnology.» *Journal of Biotechnology*, vol. 41, p. 177.

Protein design **التصميم البروتيني**

H. Zhao, K. Chockalingam and Z. Chen (2002), «Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 13, p. 104.

B. van den Burg and V. Eijsink (2002), «Selection ofmutations for increased protein stability.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 13, p. 333.

U.Heinemann, G. Illing, H Oschkinat (2001), «High-throughput three-dimensional protein structure determination.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 12, p. 348.

D. Wahler and J. L. Reymond (2001), «Highthroughput screening for biocatalysts.»*Current Opinion in Biotechnology*, vol. 12,p.535.

Gene therapy العلاج الجيني

A. Mountain (2000), «Gene therapy: the first decade.» *Trends in Biotechnology*, vol.18, p.119.

N. Wu and M. M. Ataai (2000), «Production ofviral vectors for gene therapy applications.»*Current Opinion in Biotechnology*, vol. 11, p. 205.

A. Mountain (1999), *Overview of Gene Therapy* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 383, Vol. Sa, U. Ney, D. Schomburg (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-S27-28315-3.

B. Carter (1999) *Viral Vectors for Gene Therapy*in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 39S. Vol. Sa, U.Ney, D. Schomburg (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28315-3.

N. Weir (1999) *Non-Viral Vectors for Gene Therapy* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 427. Vol. Sa, U.Ney, D. Schomburg (ed.).VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28315-3

A. M. L. Lever (1997). *Gene therapy* in Molecular Biology in Medicine, 284. T. M Cox, J. Sinclair (ed.). Blackwell Science Ltd., ISBN 0-632-02785-1.

Proteomics دراسة البروتيوم

R. Burgess and B. Witholt (2002), «Protein research proteomics and applied enzymology.» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 13, p. 289.

N. Dovichi, S. Ru, D. Michels, Z. Zhang, S. Krylov (2001). *Proteome Analysis by Capillary Electrophoresis* in Biotechnology 2^{nd} Edition, 269. Vol. 5b. C. Sensen (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28328-5.

D. Figeys (2001), *Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry for Proteomic Studies: State-of the-Art in Biotechnology* 2^{nd} Edition, 241. Vol. 5b. C Sensen (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-52728328-5.

Y. F. Leung and C. P. Pang (2001), «Trends in proteomics.» *Trends inBiotechnology*, vol. 19, p. 480.

S. P. Gygi, G. L. Corthals, Y. Zhang, Y. Rochon and R. Aebersold (2000), «Evaluation of twodimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology.» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol.97, p. 9390.

P. A. Raynes and J. R. Yates, 3rd (2000). «Proteome, profiling-pitfalls and progress.» *Yeast*, vol. 17, p.81.

M. F. Lopez (2000), «Better approaches to finding the needle in a haystack: optimizing proteome analysis through automation.»*Electrophoresis*, vol.21, p.1082.

R. Kellner, F. Lottspeich and R. Meyer (1999) *Microcharacterization ofProteins*, 2nd, Wiley VCR. ISBN 3-527-30084-8.

F. Lottspeich (1999). «Proteome Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins.» *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 38, p. 2476.

Drug screening **غربلة الأدوية**

T. Hansson, C. Oostenbrink, W. van Gunsteren (2002), «Molecular dynamics simulations.»*Current Opinion in Structural Biology*, vol. 12, p. 190.

L. N. Kinch and N. V.Grishin (2002). «Evolution of protein structures and functions.»*Current Opinion in Structural Biology*, vol. 12, p.400.

M. Norin and M Sundstrom (2002). «Structural proteomics: developments in structure-to-function predictions.» *Trends inBiotechnology*, vol. 20, p. 79.

J. Saven (2002), «Combinatorial protein design.» *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 12, p. 453.

T. Reiss (2001). «Drug discovery of the future: the implications of the human genome project.» *Trends in Biotechnology*, vol. 19, p. 496.

C. Ramanathan and D. Davison (2001),*Pharmaceutical Bioiriformatics and Drug Discovery* in Biotechnology. 2nd Edition, 123.Vol. 5b. C Sensen (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3527-28328-5.

J. N. Kyranos, H. Cai, D Wei, W. K. Goetzinger (2001), «High-throughput high-performance liquid chromatography/mass spectrometry for modern drug discovery.» *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 12, p. 105.

R. M. Lawn and L. A. Lasky (2000), «Phannaceutical biotechnology: The genomes are just the beginning.» *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 11, p. 579.

J. Gregersen (1995),*Biomedicinal Product* De*velopment* in Biotechnology 2nd Edition, 213. Vol. 12, D. Brauer (ed.). VCRWiley, ISBN 3-527-28322-6

Bioinformatics **المعلوماتية الحيوية**

T. D.Wu (2001), «Bioinformatics in the postgenomic era.» *Trends inBiotechnology*, vol. 19, p. 479.

P. Rice (2001), *Bioinformatics: Tools for DNA Technologies* in Biotechnology 2nd Edition, 61. Vol. 5b, C. Sensen (ed.). VCHWiley, ISBN 3-527-28328-5.

D. Wishart (2001),*Bioinformatics: Tools for Protein Technologies* in Biotechnology 2nd Edition, 325. Vol. 5b, C. Sensen (ed.). VCH Wiley, ISBN 3-527-28328-5.

E. Zdobnov, R. Lopez, R. Apweiler and T. Etzold (2001)*, Bioinformatics: Using the Molecular. Biology Data* in Biotechnology 2nd Edition, 281. Vol. 5b, C. Sensen (ed.). VCHWiley, ISBN 3-527-28328-5.

M. Cygler, A. Matte and J. Schrag (2001),*Bioinformatics: Structure Information* in Biotechnology 2nd Edition, 345. Vol. 5b, C. Sensen (ed.); VCR-Wiley, ISBN 3-52728328-5.

E. Poetzsch (1995), *Databases in Biotechnolo*gy in Biotechnology 2nd Edition, 323. Vol. 12, D. Brauer (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28322-6.

Metabolism **الأيض - الاستقلاب-**

G. Michal (1999), *Biochemkal Pathways*, Spelctrum Akademischer Verlag. ISBN 386025-239-9.

R. Kramer and G. Sprenger (1993) *Metabolism* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 50. Vol. 1, H. Sahm (ed.). VCR Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28337-4

Metabolic engineering **الهندسة الأيضية**

B. Christensen and J. Nielsen (2000), «Metabolic network analysis: A powerful tool in metabolic engineering.» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 66, p. 209.

I. Fotheringham (1999), *Engineering Microbial Pathways for Amino Acid Production* in Biotechnology, 2nd Edition, 313, Vol. 8a, D. Kelly (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-30104-6.

G. N. Stephanopoulos, A. A. Aristidou, J, Nielsen (1998), *Metabolic Engineering -Principles and Methodologies*, Academic Press, ISBN 0-12-666260-6.

J. Hansen and M. C. Kielland-Brandt (1996), «Modification of biochemical pathways in industrial yeasts.» *Journal of Biotechnology*, vol. 49, p. 1.

H. Sahm (1993). *Metabolic Design* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition, 189. Vol. 1, H. Sahm (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-52728337-4.

System biology **علم أحياء (بيولوجيا) النظم**

H. Kitano (2002), «Systems biology: a brief overview.» *Science*, vol.295, p. 1662.

L. M. Loew, J. C. Schaff (2001), «The Virtual Cell: a software environment for computational cell biology.» *Trends inBiotechnology*, vol. 19, p. 401.

M. L. Simpson, G. S. Sayler, J.T.Fleming, B. Applegate (2001), «Whole-cell biocomputing.» *Trends inBiotechnology*, vol. 19, p. 317.

Safety in genetic engineering **الأمان في الهندسة الوراثية**

M. Droge, A. Pühler and W. Selbitschka (1998), «Horizontal gene transfer as a biosafety issue: a natural phenomenon of public concern.» *Journal of Biotechnology*, vol. 64, p. 75.

D. Brauer, M. Broker, C. Kellermann and E. Winnacker (1995),*Biosafety in rDNA Research and Production* in Biotechnology 2nd Edition, 63. Vol. 12, D. Brauer (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28322-6.

T. Medley and S. McCammon (1995). *Strategic Regulations for Safe Development of Transgenic Plants* in Biotechnology 2nd Edition, 197. Vol. 12, D. Brauer (ed.). VCH Wiley, ISBN 3-527-28322-6.

R. Simon and W Frommer (1993) *Safety Aspects in Biotechnology* in Biotechnology Second, Completely Revised Edition. 835. Vol. 2, A. Pühler (ed.). VCH Verlagsgesellschaft, ISBN 3-527-28312-9.

Regulation of products derived fromss biotechnology **تنظيم المنتجات المنحدرة من التقانة الحيوية**

H. Hasskarl, R. Kretzschmar, K-J. Hahn and M. Zahn (1991) *Pharmaceuticals, General Survey and Development* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition A19, 273. Wiley-VCR, ISBN 3-527-20119-X.

Ethical considerations and acceptance — الاعتبارات الأخلاقية والقبول

P. J. Dale (1999), «Public reactions and scientific responses to transgenic crops.» *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 10, p. 203.

R. E. Spier (1998), «Animal and plant cell technology: a critical evaluation of the technology/society interface.» *Journal of Biotechnology*, vol. 65, p. 111.

S. Huttner (1995) *Government, Researchers and Activists:* The *Critical Public Policy Inteiface* in Biotechnology 2nd Edition, 459. Vol. 12, D. Brauer (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28322-6.

D. Macer (1995) *Biotechnology and Bioethics: What* is *Ethical Biotechnology?* in Biotechnology 2nd Edition, 115. Vol. 12, D. Brauer (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-52728322-6.

E. Weise, H. Friege, G. Altner, P. Schmitz and K. Klostermaier (1995) *Ethics and Industrial Chemistry* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition B7, 1. Wiley-VCH, ISBN 3-527-20137-8.

H. Kepplinger and S. Ehmig (1995),*Press Coverage of Genetic Engineering in Germany; Facts, Faults and Causes* in Biotechnology, 2nd Edition, 495. Vol. 12, D. Brauer (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28322-6.

Patents in biotechnology — براءات الاختراع في التقانة الحيوية

R. S. Crespi (2000), «Genomics, proteomics and patents.» *Trends inBiotechnology*, vol. 18, p.405.

E Szarka (1999), «Patenting in biotechnology: a review of the 20th symposium of ECB8.» *Journal of Biotechnology*, vol. 67, p.1.

J. Gresens (1996), *Patents and Trade Secrets* in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 4th Edition 18, 61 Interscience-Wiley, ISBN 0-471-52687-8.

J. Straus (1995),*Biotechnology and Intellectual Property* in Biotechnology 2nd Edition, 281. Vol. 12,D. Brauer (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28322-6.

J. Gregersen (1995) *Patent Applications for Biomedicinal Products* in Biotechnology 2nd Edition, 299. Vol. 12, D. Brauer (ed.). VCH-Wiley, ISBN 3-527-28322-6

W. Hauf (1990) *Patents* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th edition Bl, 13. Wiley-VCH ISBN 3-52720131-9.

International aspects of biotechnology — هيئات التقانة الحيوية الدولية

A. Schmid, F. Hollmann, J. Park and B. Buhler (2002). «The use of enzymes in the chemical industry in Europe.» *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 13, p. 359.

Ernst &Young (2002), *Beyond Borders -The Global Biotechnology Report 2000. Ernst &Young 2002*, <http://www.ey.com/uk>.

Ernst &Young (2001), *Integration-Ernst &Young's Eigth Annual European Life Science Report 2001*, <http://www.ey.com/uk>.

Ernst &Young (2001), *Focus* on *Fundamentals -The Biotechnology Report*. <http://www.ey.com/uk>.

Ernst &Young (2000),*Convergence: The Biotechnology Industry Report, Millenium Edition*, <http://www.ey.com/uk>.

T. Beppu (2000). «Development of applied microbiology to modern biotechnology in Japan.» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 69, p. 41.

R. Schmid, B. Chung, A. Jones, S. Saono, J. Scriven and J. Tsai (1995), *Biotechnology in the Asian-Pacific Region* in Biotechnology 2nd Edition, 369, Vol. 12, D. Brauer (ed.). VCH-Wiley, JSBN 3-527-28322-6.

فهــــرس

ـ ب ـ

- ت -

- ث -

- ج -

- ح -

- خ -

- د -

- ع -

- غ -

ـ ل ـ

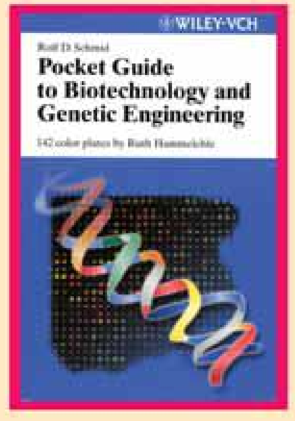
ـ م ـ

ـ ن ـ

ـ هـ ـ

- و -

دليل التقانة الحيوية والهندسة الوراثية(*)



(*) الكتاب الثاني من التقنية الحيوية

السلسلة: تضم هذه السلسلة ترجمة لأحدث الكتب عن التقنيات التي يحتاج إليها الوطن العربي في البحث والتطوير ونقل المعرفة إلى القارئ العربي.

الكتاب: أصبحت التقانة الحيوية والهندسة الوراثية تقانتا القرن الواحد والعشرين الأكثر أهمية. فلقد مهدت التقانتان إلى تطبيق نتائج علوم مثل بايولوجية الخلية، وعلم الوراثة، والكمياء الحيوية، وعلم الأحياء الدقيقة، والهندسة الوراثية، والمعلوماتية الحيوية... وغيرها، في مجالات العناية الصحية، والزراعة، وإنتاج الغذاء، والحماية البيئية، وطرائق الإنتاج البديل للكميائيات.. وغيرها.

يوفر هذا الدليل الميسر نظرة موسعة للحقائق ذات الصلة بالمنتجات والطرائق، والتطبيقات فيما يناقش المخاطر المحتملة، والمفاهيم الأخلاقية والأثر الإقتصادي، وسلامة الإستهلاك التي تستخدم هذا التطبيق.

الدليل مدعم بشكل كامل بتوضيحات موجهة بألوان زاهية وبأسلوب تعليمي ميسر.

يعد الكتاب مدخلاً متكاملاً إلى حقل التقانة الحيوية والهندسة الوراثية يهم كل من المتخصص والطالب على حد سواء.

المؤلف: **رولف د. شميد**: بروفيسور تقانة الانزيمات في جامعة برونشوايغ، وجامعة شتوتفارت، ألمانيا، ومدير معهد الكيمياء الحيوية التقانية التابع لمركز هندسة السيرورات الحيوية، ألمانيا.

المترجمون: **د. نجم الدين جميل الشرابي**: بروفيسور الأحياء الدقيقة، كلية الزراعة، جامعة دمشق.

أ. محمد سامر الرفاعي: إجازة في البايولوجيا الجزيئية من جامعة لويس باستور، ستراسبورغ، فرنسا.

د. أنطونيوس الداود: دكتوراه في التكنولوجيا الحيوية النباتية، والهندسة الوراثية.

سلسلة كتب التقنيات الاستراتيجية والمتقدّمة

1. المياه
2. البترول والغاز
3. البتروكيمياء
4. النانو
5. التقنية الحيوية
6. تقنية المعلومات
7. الإلكترونيات والاتصالات والضوئيات
8. الفضاء والطيران
9. الطاقة
10. المواد المتقدمة
11. البيئة

مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية KACST

المنظمة العربية للترجمة

الثمن: 80 دولاراً
أو ما يعادلها


ISBN 978-9953-82-494-9